

HOVEDFAGSOPPGAVE I LEGEMIDDELANALYSE FOR GRADEN CAND. PHARM.

Margot Lygren Austnaberg

Optimalisering av betingelser for å fjerne HSA

- effekt på peptidkonsentrasjon i vandige løsninger -



Avdeling for farmasøytisk kjemi

Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

Universitetet i Oslo

Høst 2005

Margot Lygren Austnaberg

Optimalisering av betingelser for å fjerne HSA

- effekt på peptidkonsentrasjon i vandige løsninger -

Hovedfagsoppgaven ble utført ved Faggruppen for legemiddelanalyse, Avdeling for farmasøytisk kjemi, Farmasøytisk Institutt ved Universitetet i Oslo i perioden november 2004 til november 2005.

Veileder:

1. amanuensis dr. Leon Reubsaet, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo.

FORORD

Jeg vil få takke 1.amanuensis dr. Leon Reubsaet for glimrende opplæring og veiledning. Dette har vært til uvurderlig hjelp både under laboratoriearbeidet og oppgaveskrivingen.

Videre vil jeg takke Bjørn Winther som også har vært til stor hjelp under laboratoriearbeidet og alle i faggruppen for legemiddelanalyse for et trivelig miljø gjennom året.

I tillegg vil jeg takke Ingvill, Karen, Torill, Eva, Maria, Therese, Christina, familien min og Oddgeir for sosiale stunder og beroligende ord.

Oslo 24. november 2005

Margot Lygren Austnaberg

INNHOOLDSLISTE

SAMMENDRAG.....	6
FORKORTELSER.....	8
1 INNLEDNING	10
1.1 BAKGRUNN	10
1.2 HENSIKT	10
2 TEORI	11
2.1 PROTEOMIKK	11
2.2 PEPTIDER OG PROTEINER	11
2.3 HSA	12
2.4 MODELLSUBSTANSER.....	13
2.4.1 Valg av modellsubstanser.....	13
2.4.2 Melatonin.....	14
2.4.3 Bradykinin	14
2.4.4 Vasopressin.....	15
2.4.5 Cytokrom c.....	16
2.5 HiTRAP™ KOLONNEN	17
2.5.1 HiTrap™ kolonnens egenskaper	17
2.5.2 Separasjonsprinsipp	18
2.6 LC-MS.....	19
2.6.1 HPLC-systemet.....	19
2.6.2 Massespektrometer	20
2.7 TRYPTISK KLIPP AV PROTEINER.....	22
3 MATERIALER OG METODER	24
3.1 KJEMIKALIER, ANALYTTER OG UTSTYR.....	24
3.2 EKSPERIMENTENE MED HiTRAP™ KOLONNEN	26
3.2.1 Tillaging av buffere	26
3.2.2 Tillaging av løsninger.....	26
3.2.3 Oppsettet for analyse med HiTrap™ kolonnen	28
3.2.4 Metode for å teste om HiTrap™ kolonnen holdt spesifikasjonene	28
3.2.5 Metode for å bestemme kapasitet av BSA og HSA.....	30
3.2.6 Metode for opparbeidelse av prøver med peptider alene eller med HSA	31
3.3 LC-MS.....	32
3.3.1 Oppsett for LC-MS analysene.....	32
3.3.2 Metode for analyse av produkter fra tryptisk klipp av HSA eller cytokrom c.....	32
3.3.3 Metode for analyse av peptidhormonene.....	33
3.3.4 Bestemmelse av signifikans.....	33
3.4 TRYPTISK KLIPP AV PROTEINER.....	34
4 RESULTATER OG DISKUSJON	36
4.1 UTVIKLING AV LC-MS METODE FOR ANALYSE AV PEPTIDHORMONER	36
4.1.1 Utvikling av LC-MS metoden.....	36
4.1.2 Linearitet og reproduserbarhet for LC-MS metoden.....	37
4.2 TEST AV HiTRAP™ KOLONNEN OG BYTTE TIL FLYKTIG BUFFER	39
4.2.1 Albumin binding til HiTrap™ kolonnen ved bruk av 20mM Na ₃ PO ₄	39
4.2.2 Bytte til flyktig buffer	41
4.3 KAPASITET AV HSA PÅ HiTRAP™ KOLONNEN	42
4.3.1 Bytte fra BSA til HSA.....	42
4.3.2 Utvikling av metoden for å teste bindingskapasitet	44
4.3.3 Gjennombrudd av HSA.....	46

4.3.4	Bindingskapasitet.....	49
4.4	MODELLSUBSTANSER PÅ HiTrap™ KOLONNEN	50
4.4.1	Eluering av peptidhormonene fra HiTrap™ kolonnen.....	50
4.4.2	Uspesifikk binding av peptidhormonene til HiTrap™ kolonnen	51
4.5	HSA INJISERT SAMMEN MED PEPTIDHORMONENE PÅ HiTrap™ KOLONNEN.....	53
4.6	BRYTING AV PEPTIDHORMONENES BINDING TIL HSA	54
4.6.1	Test av toleranse.....	54
4.6.2	Bryting av bindingen mellom HSA og peptidhormonene.....	55
4.7	FORSØK MED PRODUKTER ETTER TRYPTISK KLIPP AV CYTOKROM C.....	56
4.7.1	Produktene etter tryptisk klipp av cytokrom c	57
4.7.2	Test av HSA stabilitet	59
4.7.3	Test av uspesifikk binding til HiTrap™ kolonnen	60
4.7.4	Test av binding mellom HSA og produkter fra cytokrom c.....	61
4.7.5	10% etanol som løsemiddel i mobilfasen på HiTrap™ kolonnen.....	62
4.7.6	10% 1-Propanol som løsemiddel i mobilfasen på HiTrap™ kolonnen	63
5	KONKLUSJON	65
6	REFERANSELISTE.....	67

SAMMENDRAG

Det ble utviklet en metode for å kunne fjerne HSA fra vannløsninger, med nedsatt tap av albuminbundne peptider. Dette ble gjort ved hjelp av en HiTrap™ Blue HP kolonne fra Amersham Biosciences.

Mobilfasen til bruk ved opparbeidelse av prøver ble endret til en flyktig buffer (150mM NH₄Ac) slik at eluater fra HiTrap™ kolonnen kunne injiseres direkte i LC-MS. Modellsustansene som ble brukt var vasopressin, melatonin, bradykinin og peptider fra et tryptisk klipp av cytokrom c.

Det ble utviklet en LC-MS metode for å detektere melatonin, vasopressin, bradykinin i eluatet fra HiTrap™ kolonnen. Produkter fra HSA og fra cytokrom c ble analysert på LC-MS med tidligere utviklede metoder.

Bindingskapasiteten av HSA på HiTrap™ kolonnen med 150mM NH₄Ac som påsettingsbuffer ble bestemt til 12mg HSA på en 1ml kolonne med et gjennombrudd på 5% (bekreftet med tryptisk klipp og LC-MS analyse av HSA).

HSA binding av peptidene ble vist for alle modellsustansene. I tillegg ble det vist en uspesifikk binding av modellsustansene til HiTrap™ kolonnen

For å binde HSA til HiTrap™ kolonnen, men bryte peptidenes binding til HSA, ble 10% etanol eller 10% 1-propanol tilsatt mobilfasen (150mM NH₄Ac). For melatonin og vasopressin ble hele den injiserte mengden eluert av HiTrap™ kolonnen (uspesifikk binding til HiTrap™ kolonnen og til HSA ble brutt). Albuminbindingen av bradykinin ble ikke påvirket.

Cytokrom c ble klippet til peptider ved hjelp av trypsin. Etter analyse på LC-MS ble det identifisert seks peptider som var produkter av cytokrom c. HSA bindingen til tre av disse ble signifikant redusert ved opparbeidelse på HiTrap™ kolonnen når 10% etanol var

tilsatt mobilfasen (150mM NH₄Ac). De viste en konsentrasjonsøkning på mellom 29,6 og 48,6%.

Det ble også gjort et enkelt forsøk med 10% 1-propanol tilsatt i mobilfasen ved opparbeidelse av peptidene fra et tryptisk klipp av cytokrom c på HiTrap™ kolonnen. Resultatene indikerte konsentrasjonsøkninger på mellom 21,6 og 86,6% for alle seks peptidene i forhold til når 150mM NH₄Ac ble brukt som mobilfase alene.

FORKORTELSER

ACN	Acetonitril
APCI	Atomic Pressure Chemical Ionization (kjemisk ionisasjon ved atmosfærisk trykk)
BDS	Base Deactivated Silica
BK	Bradykinin
BSA	Bovine Serum Albumin (bovint serumalbumin)
CH ₃ COOH	Eddiksyre
Da	Dalton
ESI	Electro Spray Ionization (elektrospray ionisering)
HCOOH	Maursyre
HSA	Human Serum Albumin (humant serumalbumin)
H ₂ O	Vann
LC-MS	Liquid Chromatography- Mass Spectrometry (væske kromatografi- masse spektrometri)
M	Molar
mM	Millimolar
mRNA	Messenger RNA (ribonucleic acid)
MT	Melatonin
m/z	Forholdet masse/ladning
nm	Nanometer
NaCl	Natriumklorid
Na ₃ PO ₄	Natriumfosfat
NH ₄ Ac	Ammoniumacetat
RSD	Relative Standard Deviation (relativt standardavvik)
SIM	Selektive Ion Monitoring (selektiv ionemonitorering)
UV	Ultraviolet (ultrafiolett)
ICH	International Conference of Harmony
i.d.	Indre diameter
IgA	Immunoglobulin A

IgG	Immunoglobulin G
NAD ⁺	Nicotinamide Adenine Dinucleotide (nikotinamid adenine dinukleotid)
NADP ⁺	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (nikotinamid adenine dinukleotid fosfat)
TEA	Trietanolamin
TIC	Total Ion Current (total ionestrøm)
VP	Vasopressin
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
A	Alanin
C / cys	Cystein
D	Apartat
E	Glutamat
F / phe	Fenylalanin
G / gly	Glysin
H	Histidin
I	Isoleusin
K	Lysin
L	Leusin
M	Metionin
N / asn	Asparagin
P / pro	Prolin
Q / gln	Glutamin
R / arg	Arginin
T / thr	Treonin
V	Valin
W	Tryptofan
Y / tyr	Tyrosin
Ser	Serin

1 INNLEDNING

1.1 Bakgrunn

Plasma og serum er meget nyttige matrikser for å kunne detektere og kvantifisere proteiner og peptider assosiert med sykdom eller det å være frisk. Den diagnostiske verdien kan ha stor betydning for om patologiske tilstander oppdages tidlig. Eksempler på biomarkører er CRP (C-Reactive Protein) ved reumatoid artritt (*Kuhn, Wu et al. 2004*) og PSA (Prostate-Specific Antigen) ved prostatakreft (*Bastian, Palapattu et al. 2005*). Disse peptidene og proteinene forekommer fra høye (g/l) til meget lave (ng/ml) konsentrasjoner. Proteiner som finnes i høye konsentrasjoner kan skjule viktig informasjon om peptider i lave konsentrasjoner ved kromatografisk analyse. Det er derfor viktig å få fjernet det meste av de hyppigst forekommende proteinene uten diagnostisk verdi med en prøveopparbeidelsesmetode før en kromatografisk analyse. HSA er det enkeltproteinene i serum med høyest konsentrasjon ($43 \pm 2,5$ mg/ml). Antitrypsin, IgG, IgA og haptoglobulin er eksempler på andre proteiner med høy serumkonsentrasjon (*Bjorhall, Miliotis et al. 2005*).

Det er blitt brukt mange ulike metoder for å fjerne HSA fra plasma og serum. De mest omtalte er proteinfelling (*Barnidge, Goodmanson et al. 2004*), og affinitetskromatografi (*Kuhn, Wu et al. 2004*). Problemet med dagens metoder er at når HSA fjernes, mistes også peptider bundet til proteinet. Dette kan føre til tap av viktig diagnostisk informasjon.

1.2 Hensikt

Hensikten med oppgaven var å kartlegge muligheten for å fjerne HSA fra prøver uten at eventuelle albuminbundne peptider blir tapt. I denne prosessen må det utvikles en metode for opparbeidelse på HiTrap™ kolonnen med eluater som kunne analyseres med LC-MS. Videre var målet å studere effekten av noen løsemidler på bryting av bindinger mellom HSA og peptider. Utvikling av en LC-MS metode for peptider er nødvendig for å bestemme innhold av peptider i eluatet etter opparbeidelse på HiTrap™ kolonnen.

2 TEORI

2.1 Proteomikk

Proteomet består av alle proteiner uttrykt fra genomet. Proteomikk er studiet av proteomet. Dette kan ses på som øyeblikksbilder fordi mengdene er dynamiske og endres over tid. Studiene kan foregå på for eksempel vev eller enkle celler

(*Hollung 19.08.2005*). Selv om hele det humane genomet i dag er kjent, er det likevel viktig å studere uttrykket av proteinene. Konsentrasjonen av ulike proteiner sier mer om cellens funksjon enn genomet alene kan gjøre. Grunnen til dette er at mengden uttrykte proteiner ikke nødvendigvis har en direkte korrelasjon med nivået av mRNA i cellene.

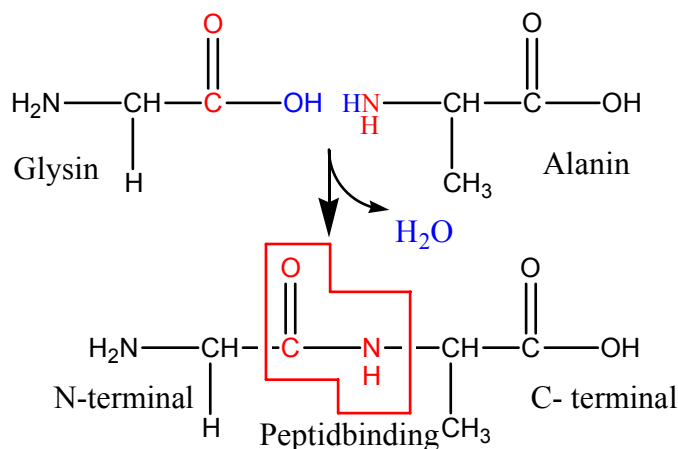
Proteomikk har nå fire ulike forskningsfelt. Den første består i å identifisere hele proteomet eller alle proteinene i en prøve. Den neste er å identifisere hvordan proteinene modifiseres. For de to siste områdene er formålet å se hvordan proteinene interagerer med hverandre og i hvor stor grad hvert protein blir uttrykt. Fordi cellene uttrykker ulike mengder proteiner i ulike tilstander er det i forbindelse med sistnevnte område at sykdomstilstander kan identifiseres eller behandlingseffekter måles (*Liebler 2002*).

2.2 Peptider og proteiner

I kroppen blir 20 ulike aminosyrer brukt når peptider og proteiner syntetiseres. Alle utenom prolin, er α -aminosyrer. De har en karboksylgruppe og en aminogruppe bundet til samme karbonatom. Dette kalles α -karbonatomet. Ulikheten mellom aminosyrene ligger i sidekjedene som varierer i struktur, polaritet og elektrisk ladning. De kan deles opp i fem ulike grupper: de med positiv ladning (arginin og lysin), de nonpolare alifatiske (glysin og alanin), de uladede polare (serin og cystein), de med negativ ladning (aspartat og glutamat) og de aromatiske (tyrosin og fenylalanin). Sidekjedene fører til at alle aminosyrene har ulik hydrofobisitet og syre-base egenskaper. De har hver sine pKa-verdier for sidekjeden samt for α -karboksylgruppen og α -aminogruppen. pKa verdiene for α -karboksylgruppen ligger for de ulike aminosyrene mellom 1,82 og 2,36 mens verdiene for α -aminogruppen ligger mellom 9,04 og 10,96. Sidekjedene er helt ulike og

pKa verdien varierer fra 3,65 til 12,48. Et mangfold av ulike peptider og proteiner kan dannes fordi aminosyrene kan settes sammen i alle mulige rekkefølger.

I proteiner og peptider blir aminosyrene bundet sammen kovalent med peptidbindinger, se figur 2.1. Kjeden kan variere i lengde fra to til flere tusen aminosyrer. Dannelsen av peptidbindinger skjer ved en kondensasjonsreaksjon, der det blir avspaltet vann. Den enden av aminosyrekjeden med en fri α -aminogruppe kalles N- terminalen mens enden med en fri karboksylsyregruppe kalles C- terminalen (Nelson and Cox 2000).



Figur 2.1: Dannelse av et dipeptid: To aminosyrer bundet sammen med peptidbinding som vist i rød ramme, avspaltning av vann er vist med blått.

Peptider og proteiner får ulik hydrofobisitet på grunn av forskjellene i aminosyrenes sidekjeder. Selv forskjeller på én aminosyre kan ha betydning for polariteten. Dette kan utnyttes i analytisk separasjon, slik at to peptider kan skilles fra hverandre i et kromatografisk system.

2.3 HSA

HSA er et protein på 66478 Da. Proteinet produseres i hovedsak i leverceller. Begge allelene av genet på kromosom 4 transkriberes til mRNA i cellekjernen. Det modne mRNA entrer cytoplasma hvor det translateres ved at 585 aminosyrer bindes sammen med peptidbindinger. Det ferdige proteinet blir raskt sekretet ut av cellen. For voksne mennesker er den vanlige plasmakonsentrasjonen av HSA på $42 \pm 3,5$ mg/ml.

HSA består av tre domener som kalles I, II og III reknet fra N-terminalen. Hvert domene består av to lengre looper separert av en kortere. Disse dannes ved hjelp av 17 disulfidbroer mellom overforstående cysteiner. De tre domenene er homologe i tertiær struktur, men har ulik ligandbindingsfunksjon på grunn av at aminosyre sammensetningen er forskjellig for dem. Dette, sammen med at proteinet har en fleksibel struktur, gjør at HSA kan binde utallige ulike ligander. Eksempler på dette er fettsyrer, steroider, bilirubin, vitamin D, folat, kalsium, sink og flere peptidhormoner. HSA kan virke som et depot for mange av stoffene det binder, slik at de blir tilgjengelige i konsentrasjoner langt over deres løselighet i blodet. HSA kan også binde potensielle toksiner og transportere dem til steder hvor de brytes ned.

På grunn av alle sidekjedene har HSA omtrent 200. Ved pH 7,4 har proteinet en nettoladning på -15 og er godt løselig i vann og fortynnede saltløsninger. Det isoelektriske punktet er ved ca pH 5. Da er nettoladningen lik null og proteinet lite løselig i vann.

På grunn av aromatiske aminosyrer som tryptofan, tyrosin og fenylalanin absorberer HSA UV-lys med et optimum ved 280 nm (*Peters 1996*).

2.4 Modellsustanser

2.4.1 Valg av modellsustanser

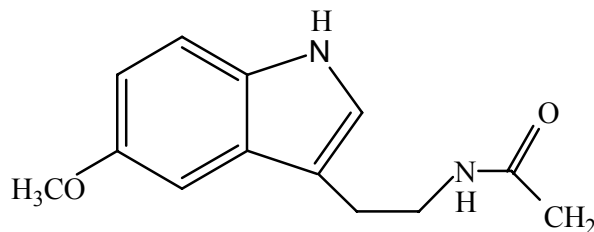
For å kunne studere binding og bryting av peptidenes binding til HSA, ble det utført eksperimenter med modellsustanser. Det var viktig at noen av modellsustansene skulle interagere med HSA. Dette var nødvendig for å kunne forsøke å bryte bindinger mellom proteinet og bundne peptider. Tre endogene peptidhormoner ble valgt ut: Melatonin, vasopressin og bradykinin. Alle tre bindes til HSA (*Peters 1996*).

I tillegg til peptidhormonene ble også produktene fra et tryptisk klipp av cytokrom c brukt som modellpeptider. Ved tryptisk klipp av cytokrom c, blir det dannet flere

aminosyresekvenser (peptider) som kunne brukes for å teste brytingen av bindingen mellom HSA og peptider.

2.4.2 Melatonin

Melatonin er et aminosyrederivat av serotonin (*Vander, Sherman et al. 2001*). Selv om melatonin kun består av en modifisert aminosyre kalles det et peptidhormon. Strukturformelen er vist i figur 2.2. Det har en molekylærvekt på 232,28 g/mol. Peptidhormonet er endogent og produseres i epifysen om natten. Det har en sedativ effekt og er med på å styre døgnrytmen. Hormonet er derfor forsøkt brukt i forbindelse med jet-lag (*Venes and Thomas 2001*).

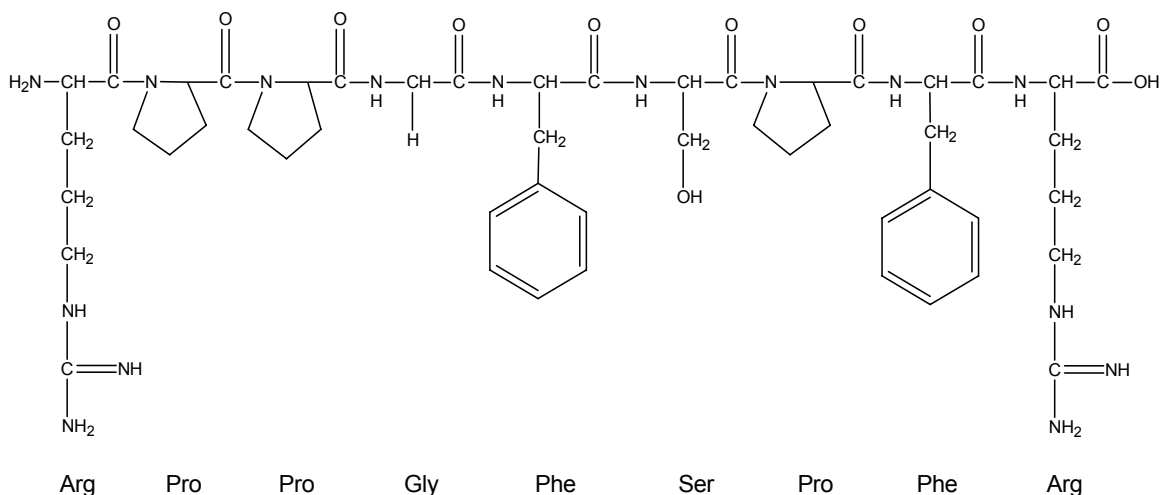


Figur 2.2: Strukturformelen til melatonin.

Melatonin har en aromatisk ringstruktur som kan delta i hydrofobe interaksjoner. Peptidhormonet har pK_a verdier som ligger utenfor området mellom 1 og 14 (pK_a 17,14 og -1,65 for aminet og 16,26 og -0,51 for amidet). Melatonin vil ikke være ladet ved opparbeidelse på HiTrap™ kolonnen (pH 7) eller ved analyse på LC-MS (pH ~2,5).

2.4.3 Bradykinin

Bradykinin er et nonapeptid med en molekylærvekt på 1060,2 g/mol. Strukturformelen er som vist i figur 2.3. Dette endogene peptidhormonet genereres enzymatisk (kallikrein) fra kininogen som er et sirkulerende peptid (*Vander, Sherman et al. 2001*). Bradykinin dannes og utøver effekt lokalt. Peptidet induserer smerte, vasodilasjon, økt vaskulær permeabilitet og gir syntese av prostaglandiner (*Hardman and Limbird 2001*).

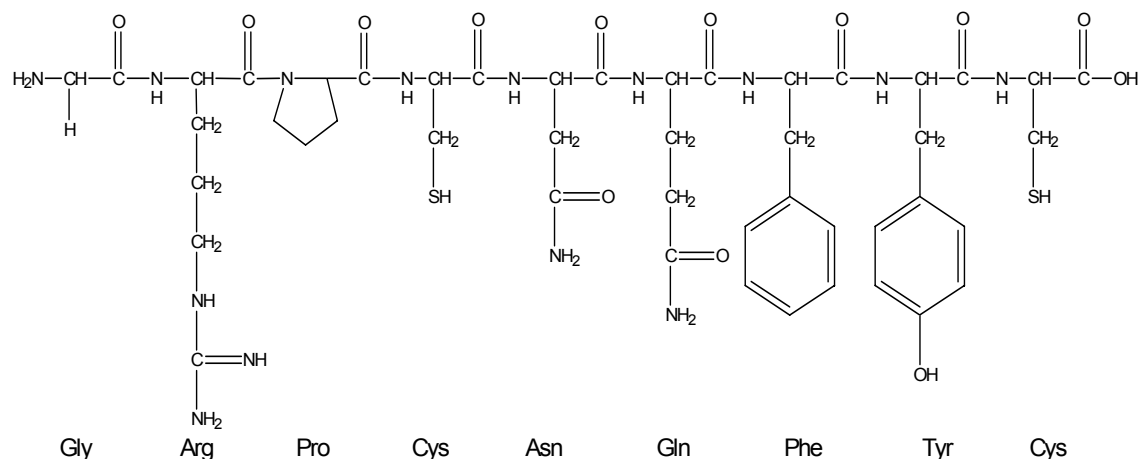


Figur 2.3: Strukturformelen til bradykinin.

Bradykinin har to guanidin sidekjeder (arginin) med en pKa verdi på rundt 12,5. De to aminogrupperne vil være positivt ladet ved opparbeidelse på HiTrap™ kolonnen og ved LC-MS analyse. I tillegg vil peptidet ha en negativ ladning i C-terminalen og en positiv ladning i N-terminalen. Serin er polar, mens prolin, glysin og fenylalanin kan delta i hydrofobe interaksjoner (*Nelson and Cox 2000*).

2.4.4 Vasopressin

Vasopressin er et nonapeptid som vist i figur 2.4. Molekylærvekten er 1084,23 g/mol. Det er et endogent peptidhormon. Produksjon av vasopressin foregår i hovedsak i hypofyse baklappen. Derfra frigjøres det ut i blodet. Hormonets hovedfunksjoner er å delta i kontrollen av vann ekskresjon gjennom nyrene samt regulering av blodtrykk ved arteriolær konstriksjon. Peptidet kan også produseres lokalt i hjernen hvor det virker som neurotransmitter eller neuromodulator for eksempel i forbindelse med innlæring og hukommelse (*Vander, Sherman et al. 2001*).

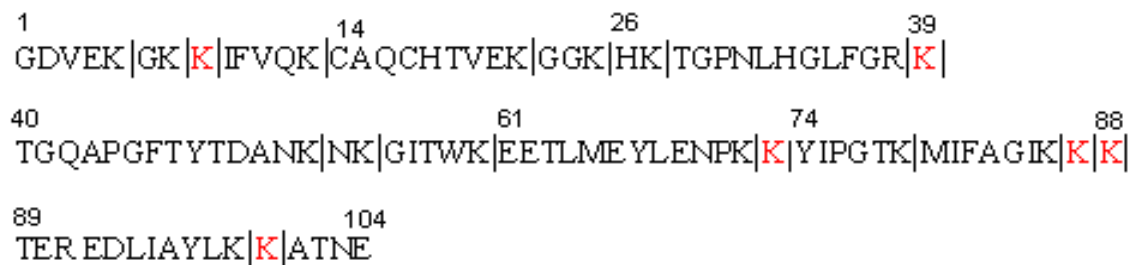


Figur 2.4: Strukturformelen til vasopressin.

Peptidet har tre sidekjerder tyrosin, fenylalanin og glysin, som kan delta i hydrofobe interaksjoner. Tyrosin kan danne hydrogenbindinger på grunn av -OH gruppen ved opparbeidelse på HiTrap™ kolonnen (pH7) og ved analyse på LC-MS (pH ~2,5). Peptidet vil ha tre ladninger ved pH ~2,5 eller 7. En negativ ladning i C-terminalen og to positive ladninger, en i N-terminalen og en som følge av sidekjeden til arginin. Resten av aminosyrene i peptidet er uladete men polare (*Nelson and Cox 2000*). Vasopressin er mindre hydrofob enn bradykinin. På en omvendt fase kolonne (f. eks C8) vil derfor vasopressin elueres først.

2.4.5 Cytokrom c

Cytokrom c er et protein som finnes i alle cellene i kroppen bortsatt fra de røde blodlegemene. I kroppen deltar proteinet i elektrontransportkjeden som er det siste trinnet i den aerobe celle respirasjonen (*Venes and Thomas 2001*). Det cytokrom c som er brukt i denne oppgaven er isolert fra hestehjerte. Proteinets har en molekylærvekt på 11702 g/mol og består 104 aminosyrer.



Figur 2.5: Aminosyresekvens av cytokrom c. Ved et fullstendig tryptisk klipp, vil det dannes 21 produkter. Punktene for klippene er markert med linjer.

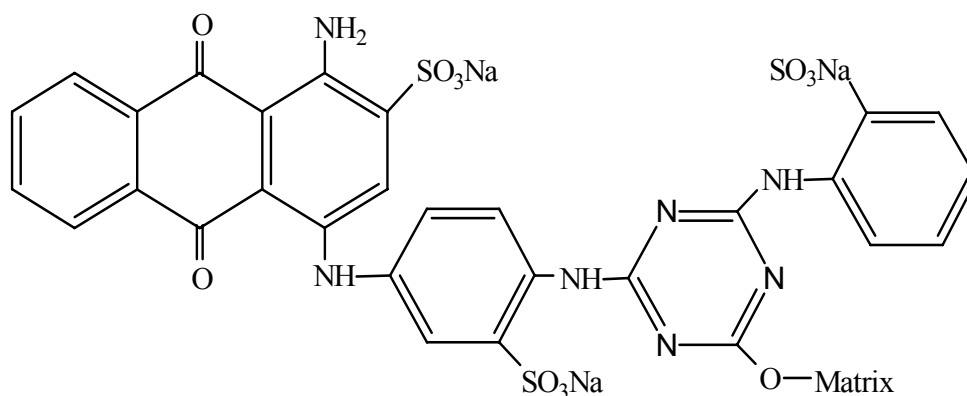
I denne oppgaven var det peptidene fra et tryptisk klipp av cytokrom c som var av interesse. En fullstendig tryptisk klipp av cytokrom c gir 16 peptider på mellom 2 og 14 aminosyrer. I tillegg dannes seks enkle aminosyrer av lysin, vist med | K | i figur 2.5.

2.5 HiTrap™ kolonnen

2.5.1 HiTrap™ kolonnens egenskaper

HiTrap™ kolonnen er laget av polymetylpenten. Dette materialet er biokompatibelt og det interagerer heller ikke med biomolekyler. Kolonnen har porøse filter i topp og bunn slik at den tåler høy flow.

Mediet i kolonnen kalles Blue Sepharose High Performance. Det består av sfæriske agarose kuler med diameter på 34µm. Liganden Cibacron™ Blue F3G-A er kovalent bundet til disse kulene gjennom triazin delen av molekylet. Delvis struktur er vist i figur 2.6 (*AmershamBiosciences 13.06.2005*). Ligandkonsentrasjonen er ca 4mg/ml gel. Hver kolonne inneholder 1 ml gel. Mediet er stabilt i pH området fra 4-12 og det tåler alle de vanligst brukte vandige buffere. Bindingskapasiteten av HSA er 16- 20mg/ml per 1ml gel (*AmershamBiosciences 12.06.2005*).



Figur 2.6: Partiell struktur av Cibacron™ Blue F3G-A. Molekylærvekten er på 773,5g/mol.

2.5.2 Separasjonsprinsipp

HiTrap™ kolonnen benytter seg av prinsippet affinitetskromatografi for å separere HSA fra komplekse løsninger. Liganden kan binde en rekke ulike proteiner. Disse er listet opp i tabell 2.1 (Amersham Biosciences 28.04.2005).

Tabell 2.1: Ulike proteiner som bindes til HiTrap™ kolonnen.

Gruppe	Proteiner
Proteiner involvert i koagulering	Protrombin og faktor IX
Nukleinsyre bindende enzymer	DNA polymerase og flere endonucleaser
NAD ⁺ avhengige enzymer	Alkohol dehydrogenase og laktat dehydrogenase
NADP ⁺ avhengige enzymer	6-fosfoglukonat dehydrogenase
ATP avhengige enzymer	Adenylat kinase og pyruvat kinase hexokinase
Andre proteiner	A-2-makroglobulin, albumin, interferon og lipoproteiner

Bindingen av flere ulike peptider og proteiner til HiTrap™ kolonnen (i tillegg til peptider og små proteins binding til HSA) kan resultere i et uspesifikt tap av plasmaproteiner og peptider som kan være av diagnostisk interesse (Echan, Tang *et al.* 2005).

Dersom proteinene som bindes uspesifikt til kolonnen ikke er av interesse i diagnostisk sammenheng kan bindingen være en fordel. De peptidene som ønskes identifisert vil bli

lettere å finne og kvantifisere når færre forstyrrende elementer er til stede i prøveløsningen.

I denne oppgaven var det bindingen av HSA som var interessant. Ved nøytral pH bindes 98% av HSA i en løsning til Cibacron Blue F3G-A. Albumin fra andre arter enn menneske bindes svakere til liganden (*Peters 1996*). HSA bindes ved hjelp av elektrostatiske- og/ eller hydrofobe interaksjoner til liganden som er en anionisk aromatisk forbindelse (*AmershamBiosciences 13.06.2005*).

2.6 LC-MS

LC-MS består av et HPLC- system for å separere analytter, etterfulgt av et massespektrometer som detektor. Sammen utgjør disse et meget godt deteksjonssystem med deteksjonsgrenser på ned til picogram nivå på kolonnen.

2.6.1 HPLC-systemet

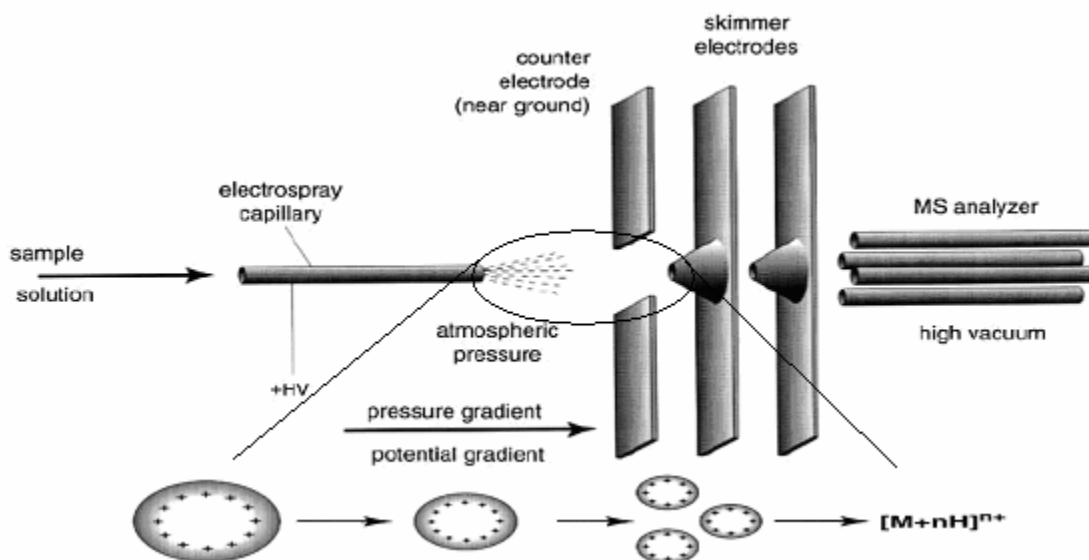
HPLC- systemet består av to mobilfasereservoar, to pumper, en autoinjektor, en degasser og en kolonne. Gjennom pumpene kan de to mobilfasene blandes i ulike forhold slik at det dannes en gradient over kolonnen. Etter hvert som gradienten øker, vil de ulike analyttene elueres av kolonnen. Degasseren brukes for å hindre at det kommer luft i systemet som kan forårsake ujevn væskehastighet.

På kolonnen separeres analyttene, avhengig av hvor mye de retarderes som følge av interaksjoner med kolonnematerialet. Omvendtfase kolonner er mest brukt. Materialet i disse kolonnene er ofte alkylkjeder av ulik lengde, for eksempel C8 eller C18, bundet til silika. Analyttene blir i hovedsak retardert av van der Waals krefter. Restsilanolgrupper kan også interagere med kationiske analytter og gi haledannelse i kromatogrammet.

Når massespektrometer brukes som detektor er det viktig at alle komponentene i mobilfasen er flyktige. Ellers kan det dannes salter i ionekilden som tetter kapillæret i massespektrometeret.

2.6.2 Massespektrometer

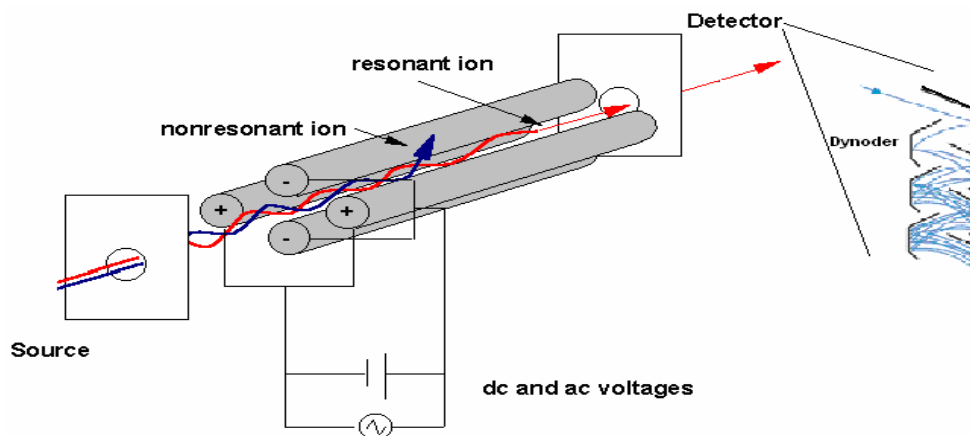
Ved kobling av HPLC til MS kreves bruk av spesielle innføringsenheter på grunn av de store gassmengdene som dannes når mobilfasen fordampes. Dersom mobilfasen flyter med en hastighet på 1-2 µl/min dannes det 1-2 ml/min med gass (*Greibrokk, Lundanes et al. 1998*). Med slike gassmengder vil trykket i massespektrometeret ikke kunne holdes konstant. Det finnes derfor flere ulike innførings og ioniseringsenheter for å lette overgangen mellom HPLC og MS. De vanligste er APCI (mest brukt for uladete molekyler) og ESI (mest brukt for ladede molekyler). Siden ESI var ioniseringen som ble brukt i denne oppgaven (se figur 2.7 (*Tissue 23.09.2005; Gaskell 1997*)) er metoden nærmere beskrevet under.



Figur 2.7: Massespektrometer med ESI. Nederst i figuren er ionefordampning illustrert.

Når mobilfasen kommer inn i innførings og ioniseringsenheten i ESI, dannes små dråper ved hjelp av et elektrisk felt og forstøvergass, N_2 . Avhengig av spenningen i ESI

kapillæret ("electrospray capillary" i figur 2.7) blir dråpene enten positivt eller negativt ladet. Dråpene blir deretter mindre når de treffer en strøm av tørkegass, N_2 . Etter hvert øker frastøtingen mellom ionene inne i dråpen. Når frastøtingen blir større enn overflatespenningen, vil dråpene bli til mindre dråper gjennom en Coulombeksplosjon. Denne prosessen fortsetter helt til ionefordamping oppnås. Videre innover i massespektrometeret passerer ionene gjennom et kapillær og forbi et sett av samlere og linser. Inngangen av kapillæret har alltid motsatt ladning i forhold til ionene som skal analyseres, slik at ionene akselereres. Mellom samlerne kan det dannes fragmenter ved at ionene kolliderer med molekyler av tørkegassen. Trykket reduseres fra atmosfærisk trykk til 10^{-6} - 10^{-8} Torr mellom inngangen av kapillæret og samlerne. Lensene fokuserer ionestrømmen.



Figur 2.8: Illustrasjon av en kvadrupol med en electron multiplier detektor.

Ved LC-MS er de mest brukte masseanalytatorene kvadrupol og ionefelle. I denne oppgaven ble det brukt en kvadupol, se figur 2.8 (*Petrovic 23.09.2005; Tissue 23.09.2005*). Den består av fire parallelle sylindere som pålegges vekselspenning. Alle ionene som passerer inn, vil bli påvirket av denne spenningen. Ustabile ioner vil kolliderer med stavene, mens ionene som oppnår stabile svingninger i kvadrupolfeltet vil bevege seg mot detektoren avhengig av blant annet ionets m/z - forhold (*Reubsaet 2003*).

I detektoren emitteres elektroner når ioner som kommer fra kvadrupolen treffer den første dynoden. Antall elektroner er direkte proporsjonal med mengden ioner som entrer

detektoren. Signalet blir amplifisert gjennom en kaskadereaksjon av sekundære elektroner som dannes fra dynode til dynode. Ved hjelp av dette signalet blir antallet ioner bestemt for hver m/z verdi etter hvert som de passerer kvadrupolen (*Petrovic 23.09.2005*). Ved hjelp av en datamaskin presenteres signalene som spektra og /eller kromatogrammer.

I bioanalyse er LC-MS et viktig verktøy. Deteksjonsgrensen er lav og spesifisiteten høy. LC-MS viser dessuten god presisjon og nøyaktighet. Det er likevel viktig med en god prøveopparbeidelse på grunn av at forurensninger selv i lave konsentrasjoner, kan påvirke kvantifiseringen som følge av detektorens høye følsomhet.

2.7 Tryptisk klipp av proteiner

Det er flere grunner til at man ønsker å klippe proteiner før analyse med LC-MS. Blant annet er sensitiviteten for bestemmelse av massen til peptider bedre enn ved direkte bestemmelse av massen til intakte proteiner. Dessuten er det veldig vanskelig å bestemme massen av store eller veldig hydrofobe molekyler. I tillegg vil den absolutte feilkilden i masse bli større jo høyere proteinets masse er.

For massebestemmelse av store proteiner, som for eksempel cytokrom c og HSA vil det derfor være en fordel å få dannet produkter før analyse på LC-MS. Dette kan gjøres ved hjelp av proteaser. Trypsin er den mest brukte. Den klipper opp aminosyrekjeder på C-terminal side av arginin og lysin dersom prolin ikke er neste aminosyre. I de fleste proteiner er arginin og lysin fordelt slik at det dannes peptider med en godt egnet lengde for MS-deteksjon. Det er generert store databaser hvor massene til klippede produkter fra ulike proteiner er registrert. På bakgrunn av dette kan databasen identifisere hvilket protein de klippede produktene tilhører (*Liebler 2002*).

Klipping gjøres i hovedsak på to måter: med eller uten denaturering (og påfølgende reduksjon og alkylering) avhengig av størrelse og disulfidbindinger. For mindre proteiner som for eksempel cytokrom c, kan trypsin alene (uten denaturering) være nok til å få

dannet et tilstrekkelig antall produkter. For større proteiner som HSA, kan det med fordel utføres denaturering, reduisering og alkylering. Å klippe store proteiner er vanskeligere på grunn av at de er så tettpakket at proteasene nesten ikke kommer til klippepunktene. Ved bruk av trypsin alene kan det bli flere miss i klippingen, slik at produktene blir større og færre. Denaturering kan gjøres ved hjelp av 8M Urea. Tilsetning av DTT fører til at disulfidbindingene reduseres til SH-grupper. Renaturering av SH-gruppene forhindres ved alkylering med IAA (*Kuhn, Wu et al. 2004*).

3 MATERIALER OG METODER

3.1 Kjemikalier, analytter og utstyr

Tabell 3.1-3.3 viser analytter, kjemikalier og utstyr brukt i laboratoriearbeidet til denne oppgaven.

Tabell 3.1: Modellsustanser og albuminer.

Navn	Leverandør
Bradykinin	Sigma, St. Louis, MO, USA
BSA	Sigma, St. Louis, MO, USA
Cytokrom C	Sigma, St. Louis, MO, USA
HSA	Sigma, St. Louis, MO, USA
Melatonin	Sigma, St. Louis, MO, USA
Vasopressin	Sigma, St. Louis, MO, USA

Tabell 3.2: Kjemikalier.

Kjemikalier	Kvalitet	Leverandør
1-propanol	HPLC gradient	Rathburn, Walkerburn, Skottland
ACN	HPLC gradient	Merck, Darmstadt, Tyskland
NH ₄ Ac	Analytisk	Merck, Darmstadt, Tyskland
CH ₃ COOH	100%	Prolabo, Manchester, England
Etanol	96%	Arkus, Oslo, Norge
Fosforsyre	85%	Prolabo, Manchester, England
HCOOH	>98%	Fluka, Buchs SG, Sveits
Metanol	HPLC gradient	Merck, Darmstadt, Tyskland
Na ₃ PO ₄ *12 H ₂ O	Analytisk	Merck, Darmstadt, Tyskland
NaCl	Analytisk	Merck, Darmstadt, Tyskland
Trietanlamin	>99%	Fluka, Buchs SG, Sveits
Trypsin	Fra bovin pankreas	Sigma, St. Louis, MO, USA

Tabell 3.3: Utstyr.

Utstyr	Type	Leverandør
HiTrap™ systemet		
Injektor	7125	Rheodyne, Rohnert Park CA, USA
Kolonne	HiTrap™ Blue HP 1ml	Amersham Biosciences, Uppsala, Sverige
Programvare	Class VP Chromatography Data System Version 4.3	Shimadzu, Kyoto, Japan
Pumpe	SD-200	Rainin, Emeryville CA, USA
Pumpe til metningskurver	Peristaltic pump P-1	Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sverige
UV-detektor	SPD-6A	Shimadzu, Kyoto, Japan
LC-MS		
Autosampler	SIL-10AD VP	Shimadzu, Kyoto, Japan
Degasser	DGU-14A	Shimadzu, Kyoto, Japan
Kolonne for separasjon av tryptisk klippede produkter fra Cytokrom C eller HSA	BioBasic 8 Dim(mm) 50x1 Particle Sz (μ) 5	Thermo Electron corporation, Cheshire, UK
Kolonne for separasjon av modellpeptider	Hypersil BDS C8 Dim(mm): 10x2,1 Particle Sz (μ): 5	Thermo Electron corporation, Cheshire, UK
Systemkontroller	SCL-10A VP	Shimadzu, Kyoto, Japan
MS-apparat	LCMS-2010 A	Shimadzu, Kyoto, Japan
Programvare	LabSolutions LCMSsolution	Shimadzu, Kyoto, Japan
Pumper	LC-10AD VP	Shimadzu, Kyoto, Japan
Annet		
Automatpipetter, ulike størrelser	Finnpipette®	Labsystems, Helsinki, Finland
pH- meter	632 pH-Meter	Metrohm, Herisau, Sveits
Pipettespisser	Finntipp	Thermo Electron Corporation, Helsinki, Finland
Sprøyte	1ml BD Plastipak™	Becton Dickinson, Oxford, England
Vannrenseanlegg	EASYpure UV D7402	Barnstead, Dubuque IA, USA
Vekt	AE200S	Mettler, Greifensee, Sveits
Vortex mikser	Vibrofix VP1 electronic	Janke & Kunkel IKA-WERK, Staufen, Tyskland

3.2 Eksperimentene med HiTrap™ kolonnen

3.2.1 Tillaging av buffere

Amersham Biosciences anbefaler to ulike buffere for bruk på HiTrap™ kolonnen når prøveløsninger injiseres (20mM Na₃PO₄ (pH 7) eller 50mM KH₂PO₄ (pH 7)). Ingen av dem er flyktige. For å se om kolonnen holdt spesifikasjonene ble 20mM Na₃PO₄ (pH 7) brukt som påsettingsbuffer. Denne ble laget ved å løse 7,6022g Na₃PO₄*12H₂O til 1000ml i en målekolbe med ionebyttet vann. pH 7 ble innstilt ved hjelp av 85% fosforsyre.

For å eluere serumalbumin av HiTrap™ kolonnen ble det brukt 2M NaCl i 20mM Na₃PO₄. Denne ble laget ved å løse 29,22g NaCl til 250ml med 20mM buffer.

I de påfølgende forsøk ble 150mM NH₄Ac brukt som flyktig buffer når prøveløsninger skulle opparbeides før analyse på LC-MS. 1,1562g NH₄Ac ble løst til 100ml med ionebyttet vann. pH i løsningen var ca 7. I de innledende forsøkene ble også andre konsentrasjoner av denne bufferen brukt. Tillagingen av disse er vist i tabell 3.4.

Tabell 3.4: Tillaging av ulike bufre med NH₄Ac.

Molaritet (mM)	NH ₄ Ac (mg)	lonebyttet vann (ml)
50	0,3854	100
100	0,7708	100
200	1,5416	100

3.2.2 Tillaging av løsninger

Peptidhormonene

Peptidhormonene ble kjøpt inn som tørrstoff og oppbevart i kjøleskap eller fryseboks etter anvisning fra produsenten. Tørrstoffet ble løst i ionebyttet vann, mens fortynningene ble gjort med 150mM NH₄Ac. Årsaken til dette var at prøvene burde justeres mot bufferens ionestyrke før injeksjon.

Stamløsningene av melatonin, vasopressin og bradykinin var på 1mg/ml. 1mg tørrstoff ble veid ut på analysevekt, løst i 1ml ionebyttet vann tatt ut med automatpipette og blandet på vortex mikser. Det ble laget to hjelpeløsninger med de tre modellsubstansene i konsentrasjoner på 10µg/ml og 1µg/ml. 10µg/ml ved å ta ut 10µl fra hver stamløsning og fortynnet til 1ml med 150mM NH₄Ac og 1µg/ml ved å fortynne 10µg/ml hjelpeløsning videre ti ganger til med 150mM NH₄Ac. Stamløsninger og hjelpeløsninger ble oppbevart ved -32 °C.

Analyttløsningene som ble brukt på HiTrap™ kolonnen var på 5µg/ml eller 500ng/ml. Hjelpeløsningene ble da fortynnet som vist i tabell 3.5.

Tabell 3.5: Tillaging av løsninger med peptidhormoner.

Konsentrasjon av peptidhormoner	Tilberedning
5µg/ml	500µl 10µg/ml hjelpeløsning + 500µl 150mM NH ₄ Ac
500ng/ml	500µl 1µg/ml hjelpeløsning + 500µl 150mM NH ₄ Ac

Serumalbumin

Det ble brukt albuminløsninger av BSA eller HSA med flere ulike konsentrasjoner og i flere ulike buffere. Tabell 3.6 viser hvordan disse ble laget.

Tabell 3.6: Tillaging av løsninger med serumalbumin.

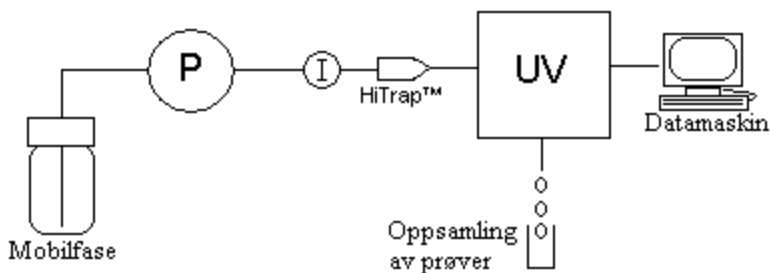
Konsentrasjon	Tørrstoff	Hjelpeløsning	Buffer
1,0 mg/ml BSA	1mg	-	1ml 20mM Na ₃ PO ₄
0,1mg/ml BSA	-	0,1ml 1mg/ml BSA	0,9ml 20mM Na ₃ PO ₄
0,3mg/ml BSA	30mg	-	100ml 20mM Na ₃ PO ₄
1,0mg/ml BSA	1mg	-	1ml 50mM NH ₄ Ac
0,25mg/ml HSA	25mg	-	100ml 20mM Na ₃ PO ₄
2,5mg/ml HSA	37,5mg	-	15 ml 50mM / 100mM / 150mM / 200mM NH ₄ Ac
20mg/ml HSA	20mg	-	1ml 150mM NH ₄ Ac

HSA og peptidhormoner

Løsninger med HSA, melatonin, vasopressin og bradykinin ble laget ved å blande 0,5ml 1µg/ml hjelpeløsning av modellsubstansene med 0,5ml 20mg/ml HSA. Prøvene ble deretter blandet forsiktig og satt ved romtemperatur i 20 timer for at HSA skulle ha tid til å binde peptidhormonene.

3.2.3 Oppsettet for analyse med HiTrap™ kolonnen

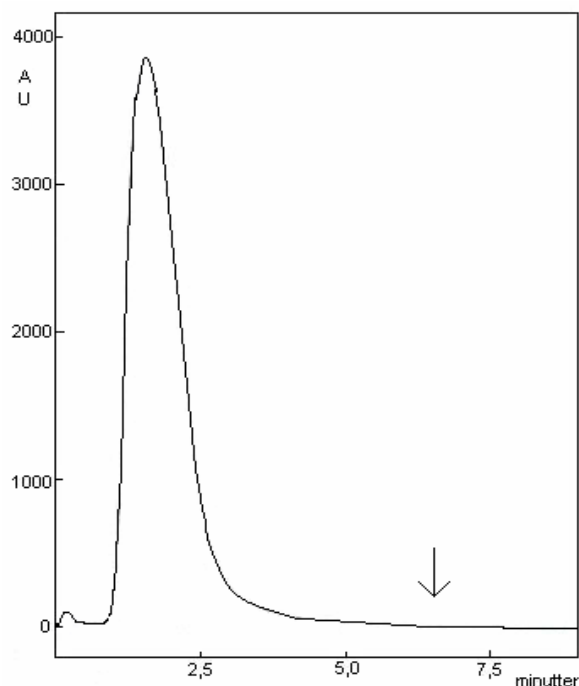
HiTrap™ kolonnen er ferdig pakket, produsert av Amersham Biosciences. Den har en indre diameter på 0,7cm, lengde på 2,5cm og et bed volum på 1ml. Oppsettet rundt HiTrap™ kolonnen bestod av et mobilfasereservoar, en pumpe, injektor, UV-detektor og en datamaskin (se figur 3.1). Injektoren var koblet til en injeksjonsloop på 1ml. For å kunne injisere et så stort volum var det nødvendig å benytte en 1ml sprøyte koblet til en injeksjonstupp. Isokratisk eluering ble brukt.



Figur 3.1: Oppsett for opparbeidelse på HiTrap™ kolonnen. P: pumpe, I: injektor og UV: detektor.

3.2.4 Metode for å teste om HiTrap™ kolonnen holdt spesifikasjonene

Ved injeksjon av 0,1mg/ml eller 1,0mg/ml BSA ble 20mM Na₃PO₄ brukt som mobilfase (se tabell 3.7). Flowhastigheten var på 1ml/min. Etter injeksjon ble mobilfase pumpet over kolonnen til linjen i kromatogrammet flatet ut (se figur 3.2). Dette skjedde i løpet av 5-10 minutter. Pumpen ble deretter stanset. UV-detektorens bølgelengde var innstilt på 254 nm.



Figur 3.2: Injeksjon av BSA på HiTrap™ kolonnen. Pilen viser hvor linjen flater ut og pumpen kunne stanses.

For å eluere BSA av kolonnen ble 2M NaCl i 20mM Na₃PO₄ pumpet over kolonnen i 10 minutter. Før injeksjon av ny prøve, ble kolonnen reekvilibrert med 10 kolonnevolum 20mM Na₃PO₄ (se tabell 3.7).

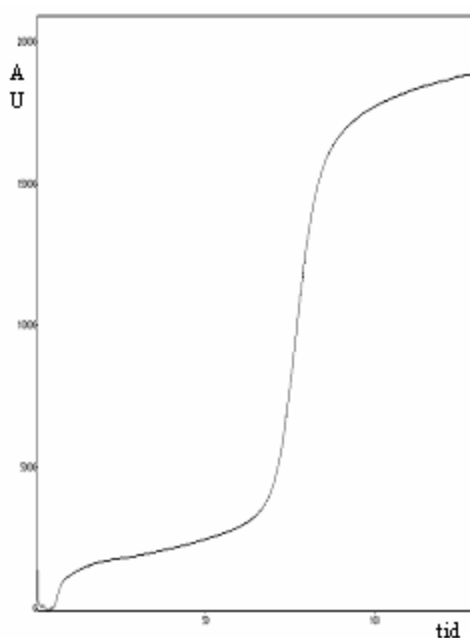
Tabell 3.7: Metoder for påsetting og eluering av BSA og re-ekvilibrering av HiTrap™ kolonnen.

Påsetting	Eluering	Re-ekvilibrering
20mM Na ₃ PO ₄ , 5-10 min	10ml 2M NaCl i 20mM Na ₃ PO ₄ , 1 ml/min	20mM Na ₃ PO ₄ 10 min
50mM NH ₄ Ac, 5-10 min		50mM NH ₄ Ac, 10 min

Metoden ble også brukt med 50mM NH₄Ac som mobilfase (se tabell 3.7) for å teste om denne bufferen gav samme resultater på HiTrap™ kolonnen som 20mM Na₃PO₄. UV-detektorens bølgelengde var da innstilt på 280 nm.

3.2.5 Metode for å bestemme kapasitet av BSA og HSA

For å bestemme kapasitet må BSA/HSA pumpes kontinuerlig over HiTrap™ kolonnen. Så lenge BSA/HSA bindes til kolonnen, vil ikke grunnlinjen øke. Ved metning vil BSA/HSA ikke lenger retarderes men komme gjennom kolonnen. Dette vises i økt UV-absorbans (se figur 3.3). BSA eller HSA ble løst i mobilfasen. Det ble benyttet en peristaltisk pumpe P1, hvor mobilfasen alltid er inne i ”tubing” for å hindre fortettinger i pumpehodet. Injektoren ble også koblet fra da et ikke var bruk for denne. UV- detektoren ble innstilt på 280 nm.



Figur 3.3: Kapasitetskurve for HSA på HiTrap™ kolonnen.

Siden senket flowhastighet gir bedre bindingskinetikk (*Fahrner and Blank 1999*), ble en flow på 0,16ml/min brukt i stedet for 1 ml/min. For at kurven skulle kunne tas opp på under to timer, ble konsentrasjonen av HSA økt til 2,5mg/ml. Rundt 30mg HSA ble pumpet over kolonnen.

Kapasiteten av HSA på HiTrap™ kolonnen kan defineres ved mengden som bindes før gjennombruddet blir større enn en gitt prosent (se figur 3.3). For å bekrefte mengde HSA i eluatet, ble det tatt ut prøver langs kapasitetskurven som ble analysert på LC-MS etter

tryptisk klipp. For å kunne regne ut prosentvis gjennombrudd på HiTrap™ kolonnen ble absorpsjonene i kapasitetskurven sammenlignes med et maksimum. Dette ble funnet ved å detektere 2,5mg/ml HSA uten HiTrap™ kolonnen (denne absorpsjonen ble tilsvarte 100% gjennombrudd).

3.2.6 Metode for opparbeidelse av prøver med peptider alene eller med HSA

Det ble laget et flowprogram for påsetting av prøver med peptider alene eller sammen med HSA som vist i tabell 3.8. UV-detektorens bølgelengde ble innstilt på 254 nm.

Tabell 3.8: Flowprogrammet for injeksjon av peptider.

Minutter	Flow
14	0,15ml/min
16	1ml/min
42	1ml/min

Som vist i tabell 3.9 ble påsetting av prøver gjort med ulike mobilfaser. For å finne ut når peptidene ble eluert samt teste bindingen til HSA ble det brukt 150mM NH₄Ac. Etanol eller 1-propanol ble tilsatt mobilfasen for å forsøke å bryte bindingen mellom peptider og HSA.

Tabell 3.9: Metode for påsetting, og eluering av prøver med peptider alene eller sammen med HSA og for re-ekvilibrering av HiTrap™ kolonnen.

Påsetting	Eluering	Re-ekvilibrering
150mM NH ₄ Ac, 41,7 min	120ml 2M NaCl i 20mM Na ₃ PO ₄ , 1 ml/min	150mM NH ₄ Ac, 10 min
10% etanol i 150mM NH ₄ Ac, 41,7 min		
10% 1-propanol i 150mM NH ₄ Ac, 41,7 min		

Under arbeidet med kapasitetskurvene ble det funnet at bindingskapasiteten ble dårligere når kolonnen ble brukt for andre gang. Med bakgrunn i dette ble det utviklet en ny metode for å eluere alt HSA av HiTrap™ kolonnen mellom hver injeksjon. Det ble

pumpet 120mM 2M NaCl i 20mM Na₃PO₄ over kolonnen med en flowhastighet på 1ml/min. Før injeksjon av ny prøve ble HiTrap™ kolonnen re-ekvilibrert med 10 kolonnevolum 150mM NH₄Ac.

3.3 LC-MS

3.3.1 Oppsett for LC-MS analysene.

For metodene beskrevet under 3.3.2 og 3.3.3 ble det benyttet ESI i positiv mode som ionekilde. Som forstøvergass og tørkegass ble nitrogen brukt i mengdene 1,5 l/min og 20 l/min. Kapillærtemperaturen var på 200 °C og spenningen over proben på 4,5 kV. Ved deteksjonen ble det brukt en enkel kvadrupol som masseanalysator. I forsøkene beskrevet under var injeksjonsvolumet 10µl.

3.3.2 Metode for analyse av produkter fra tryptisk klipp av HSA eller cytokrom c

Det ble brukt en tidligere utviklet en analysemetode for å separere og detektere produktene av trypsin klippet HSA i LC-MS (*Winther 2005*). Kolonnen var BioBasic-8. Mobilfase A bestod av 10mM CH₃COOH mens mobilfase B inneholdt 95% ACN i 10mM CH₃COOH (10mM CH₃COOH ble laget ved å fortynne 0,570ml 100% CH₃COOH til 1000ml med ionebyttet vann i en målekolbe). Gradienten vist i tabell 3.8 ble brukt. Flowhastigheten var på 0,05ml/min i analysen og 0,08ml/min ved re-ekvilibrering av kolonnen (35,5 til 39,5minutter). Deteksjonen ble utført fra 2-35 minutter. For HSA ble deteksjonen gjort med fullt sveip fra m/z 250-500 i tillegg til SIM verdiene m/z 464,5 og m/z 395,45. Deteksjonen av cytokrom c ble gjort med SIM verdier på m/z 302,75, m/z 317,85, m/z 339,9, m/z 390,4, m/z 478,35, og m/z 533,9.

Tabell 3.8: Mobilfasegradient for deteksjon av HSA.

Tid (min)	Mobilfase A (%)	Mobilfase B (%)
1	100	0
30	40	60
32	40	60
33	100	0
40	100	0

3.3.3 Metode for analyse av peptidhormonene

Melatonin, bradykinin og vasopressin ble separert på en Hypersil BDS C8 kolonne. Deteksjon ble gjort med SIM på henholdsvis m/z 233, m/z 354,3 og m/z 543,1. Mobilfase A bestod av 0,1% HCOOH (0,1% HCOOH ble laget ved å fortynne 0,1ml >98% HCOOH til 100ml med ionebyttet vann i en målekolbe) mens mobilfase B var ren ACN. En flowhastighet på 0,1ml/min ble brukt. Gradienten var som vist i tabell 3.9.

Tabell 3.9: Mobilfasegradient for deteksjon av peptider .

Tid (min)	Mobilfase A (%)	Mobilfase B (%)
0,5	95	5
8,0	60	40
12,0	60	40
14,0	95	5
20,0	95	5

3.3.4 Bestemmelse av signifikans.

For å finne ut om endringer i konsentrasjoner mellom de ulike forsøkene var signifikante ble det utført t-tester. Formelen for å regne ut t-verdiene er gitt i figur 3.1.

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{s} \cdot \sqrt{\frac{N_1 \cdot N_2}{N_1 + N_2}}$$

\bar{x}_1 : Gjennomsnitt for første prøverekke

\bar{x}_2 : Gjennomsnitt for andre prøverekke

s: Metodens standardavvik

N_1 : Antall analyser i første prøverekke

N_2 : Antall prøver i andre prøverekke

Frihetsgrader, $n = N_1 + N_2 - 2$

Figur 3.1: Formel for utregning av t-verdier.

Det var mest interessant å se etter nedgang i konsentrasjonen av peptidhormoner (melatonin, vasopressin og bradykinin) eller produkter fra et tryptisk klipp av cytokrom c i forhold til referanseprøver. Det ble derfor valgt å teste ensidig. Fortegnene i resultatet av utregningen blir da tatt med i vurderingen av t-verdiene. For å kunne trekke konklusjoner om signifikans, var det nødvendig å sammenligne t-verdiene med kritiske verdier for et riktig antall frihetsgrader (kritiske verdier er oppgitt i tabeller i kapittel 4). T-verdier som er høyere enn den kritiske verdi for 95% statistisk signifikans regnes som signifikante, mens de t-verdiene som er lavere er ikke-signifikante. Antallet frihetsgrader regnes ut som vist i figur 3.1 (*Langmyhr 1987*).

3.4 Tryptisk klipp av proteiner

Tillaging av løsninger og buffere

0,1M TEA buffer med pH 7,3 ble laget ved å veie ut 1,4919g flytende TEA. Dette ble fortynnet til 100ml med ionebyttet vann i en målekolbe. pH ble regulert med 100% CH₃COOH.

Trypsin til bruk ved klipping (0,1mg/ml) ble laget i TEA buffer. Det ble veid ut 1mg trypsin tørrstoff som ble løst i 1 ml 0,1M TEA buffer med pH 7,3. Fortynningen til 0,1mg/ml ble gjort ved å ta ut 0,1 ml og tilsette 0,9ml buffer.

Tryptisk klipp av HSA

Standardprøvene med HSA ble fortynnet med 0,1M TEA buffer til en konsentrasjon på ca 100µg/ml. Løsningen ble deretter tilsatt trypsin i forholdet 1:20, før den ble satt i varmeskap i 22 timer ved 37 °C. I de fraksjonene som ble tatt ut i løpet av bindingskapasitetskurven for HSA (3.2.6) var konsentrasjonen av proteinet ukjent. Prøvene (1ml) ble dampet inn og reløst 1ml i TEA buffer. For å klippe HSA ble det tilsatt 2µl 0,1mg/ml trypsin før prøvene ble satt i varmeskap. Denne trypsin konsentrasjonen var nok til 1ml løsning med 1mg/ml proteiner. For de første prøvene var trolig trypsin konsentrasjonen noe høy. Derimot var den nok litt lav for den prøven som ble tatt ut sist. Før analyse på LC-MS ble prøvene fortynnet 10 ganger med 10mM CH₃COOH.

Tryptisk klipp av cytokrom c

En løsning med 25µg/ml peptider fra et tryptisk klipp av cytokrom c skulle injiseres på HiTrap™ kolonnen. En cytokrom c løsning på 100µg/ml ble laget ved å fortynne 50µl av en 2mg/ml stamløsning til 1 ml med 900µl TEA buffer og 50µl 0,1mg/ml trypsin. Prøven ble satt i varmeskap ved 37°C i 24 timer og deretter fortynnet til 50µg/ml med 150mM NH₄Ac. Før injeksjon på HiTrap™ kolonnen ble de prøvene som bare skulle inneholde peptider fortynnet videre med samme buffer til 25µg/ml.

De prøvene som også skulle inneholde HSA ble blandet i forholdet 1:1 av 50µg/ml peptider og 20mg/ml HSA. For at peptidene skulle bindes til HSA ble løsningen blandet forsiktig og satt ved romtemperatur i 20 timer.

4 RESULTATER OG DISKUSJON

4.1 Utvikling av LC-MS metode for analyse av peptidhormoner

4.1.1 Utvikling av LC-MS metoden

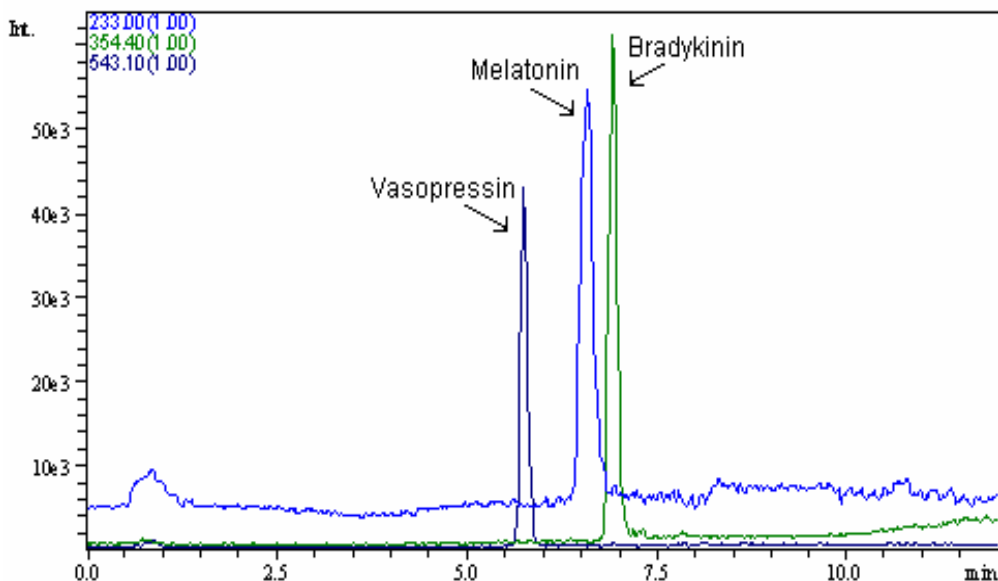
Mobilfasene A og B var henholdsvis 0,1% HCOOH og ren ACN. Mobilfase A var sur (pH~2,5) slik at vasopressin og bradykinin var ionisert (melatonin var uladet) på kolonnen (Hypersil BDS C8) i tillegg til at eventuelle frie silanolgrupper ikke var ladet.

M/z for peptidhormonene ble funnet ved å analysere prøvene med fullt sveip. Når de høyeste m/z verdier for hver analytt var funnet, ble det brukt SIM. Metoden som ble brukt til slutt, er vist under 3.3.3. Tabell 4.1 viser molekylærvekt, m/z-verdier og retensjonstid for peptidhormonene. Signalet med høyest intensitet ble brukt videre i metoden. Denne m/z verdien er vist med uthevet skrift i tabell 4.1.

Tabell 4.1: Masse, m/z og retensjonstid for peptidhormonene.

	Molekylærvekt	m/z	Retensjonstid (n=4)
Bradykinin	1060,2	1061 531 354,4	7,27
Melatonin	232,28	233	6,61
Vasopressin	1084,23	1085 543,1 362,5	5,99

Retensjonstidene (gjennomsnitt for fire standardprøver på 25ng/ml) for peptidhormonene er vist i tabell 4.2 med RSD på 0,14% for bradykinin, 0,28% for melatonin og 0,32% for vasopressin. Figur 4.1 viser et typisk kromatogram av peptidhormonene fra en standardkjøring (25ng/ml).

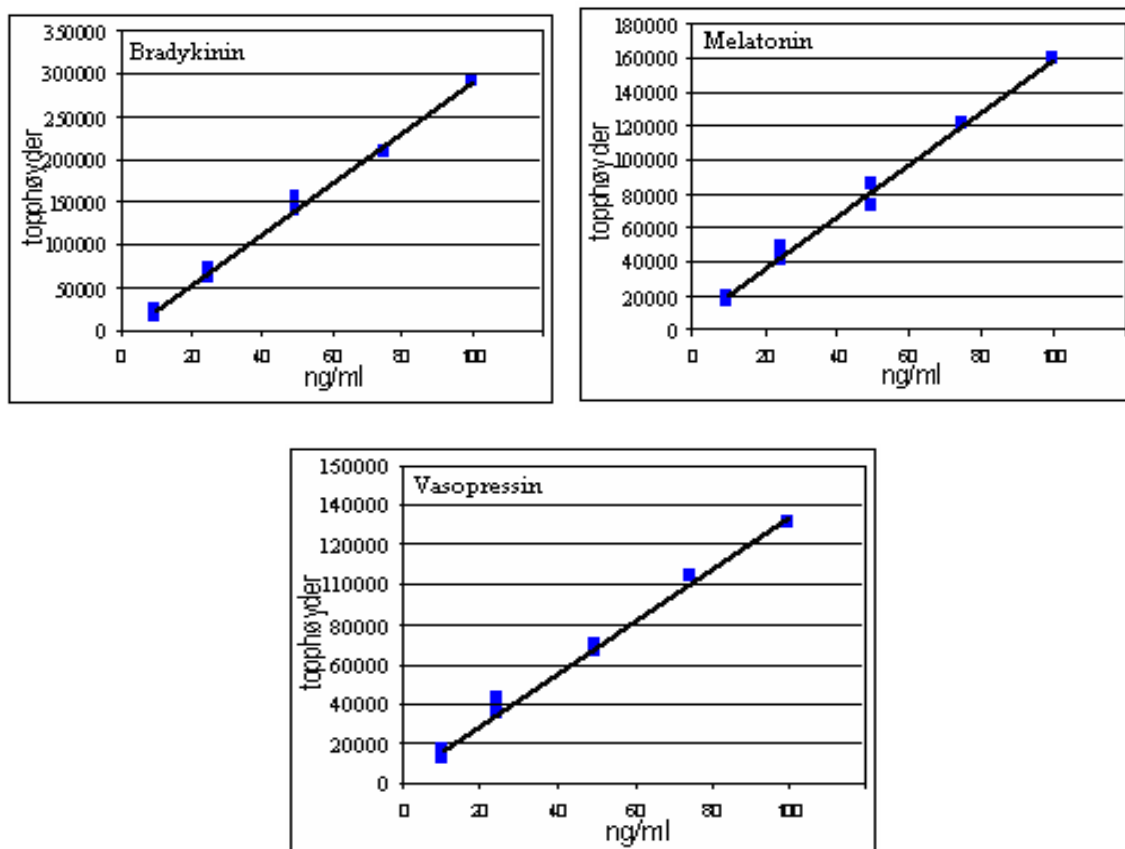


Figur 4.1: SIM-kromatogrammer fra LC-MS.

Analysetiden var på til sammen 20 minutter (inkludert kolonne re-ekvilibrering på 8 minutter).

4.1.2 Linearitet og reproduktibilitet for LC-MS metoden

For å teste lineariteten av metoden for deteksjon av peptidhormonene ble det laget standardkurver i konsentrasjonsområdet mellom 10ng/ml og 100ng/ml. Det er ikke blitt funnet litteratur på injeksjon av peptider på HiTrap™ kolonnen med påfølgende deteksjon (LC-MS) det var derfor usikkert hvilken konsentrasjon eluatet fra kolonnen ville ha ved LC-MS analyse. Standardkurvene for peptidhormonene ble derfor laget over et relativt stort konsentrasjons område. Vasopressin, melatonin og bradykinin ble løst og fortynnet i 10mM CH₃COOH før injeksjon i LC-MS. Kalibreringskurvene er standardkurvene vist i figur 4.2



Figur 4.2: Standardkurver for bradykinin, melatonin og vasopressin.

Metodens korrelasjonskoeffisienter (r) og regresjonslinjer er vist i tabell 4.2. For regresjonslinjene $y=ax+b$, beskriver x konsentrasjon, y respons og b punktet der kurven skjærer y -aksen. Korrelasjonskoeffisientene til peptidhormonene varierer minimalt fra 1.0.

Tabell 4.2: Linearitet i LC-MS metoden.

Modellsubstans	Regresjonslinje $y=ax+b$	Korrelasjonskoeffisient r
Bradykinin	$y=2960,5x-7214,8$	0,997
Melatonin	$y=1548,4x+3792,5$	0,996
Vasopressin	$y=1311,6x+3019,1$	0,997

Repeterbarheten ble bestemt på følgende måte. En standardprøve av peptidhormonene (18,3 ng/ml) ble analysert på LC-MS i fire ganger på samme dag. RSD var på henholdsvis 5,2%, 4,6% og 3,8% for vasopressin, melatonin og bradykinin. De lave RSD

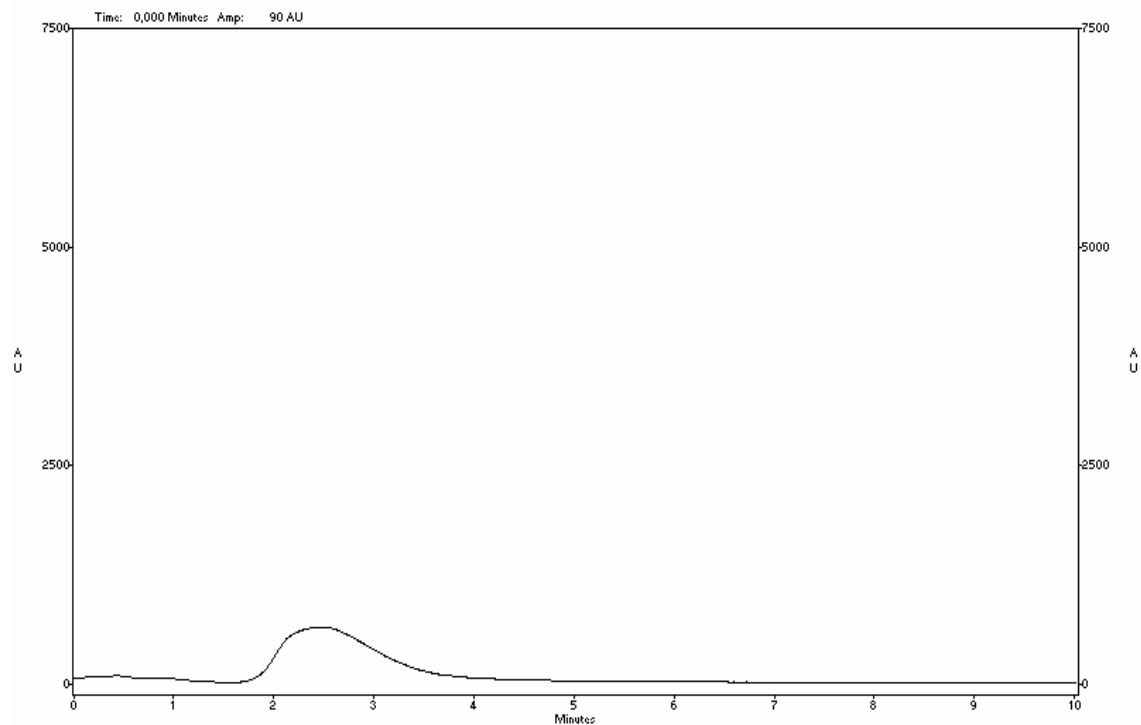
verdiene tyder på at metoden har god repeterbarhet. Den konsentrasjonen av peptidhormonene som etter hvert ble mest brukt ved injeksjon på HiTrap™ kolonnen var 500ng/ml. Etter opparbeidelse ville den teoretiske konsentrasjonen av peptidhormonene være på 18,3ng/ml. RSD ble derfor bestemt for denne konsentrasjonen.

RSD ble også regnet ut etter LC-MS analyser av standardprøver på tre ulike dager. Antall analyser var 19. Konsentrasjonen av peptidhormonene var 18,3ng/ml. RSD var på 16,9% for vasopressin, 22,0% for melatonin og 10,1% for bradykinin. RSD mellom dager var betraktelig høyere enn innenfor samme dag. Av denne grunn ble det bestemt å sammenligne alle prøvene med standarder analysert samme dag.

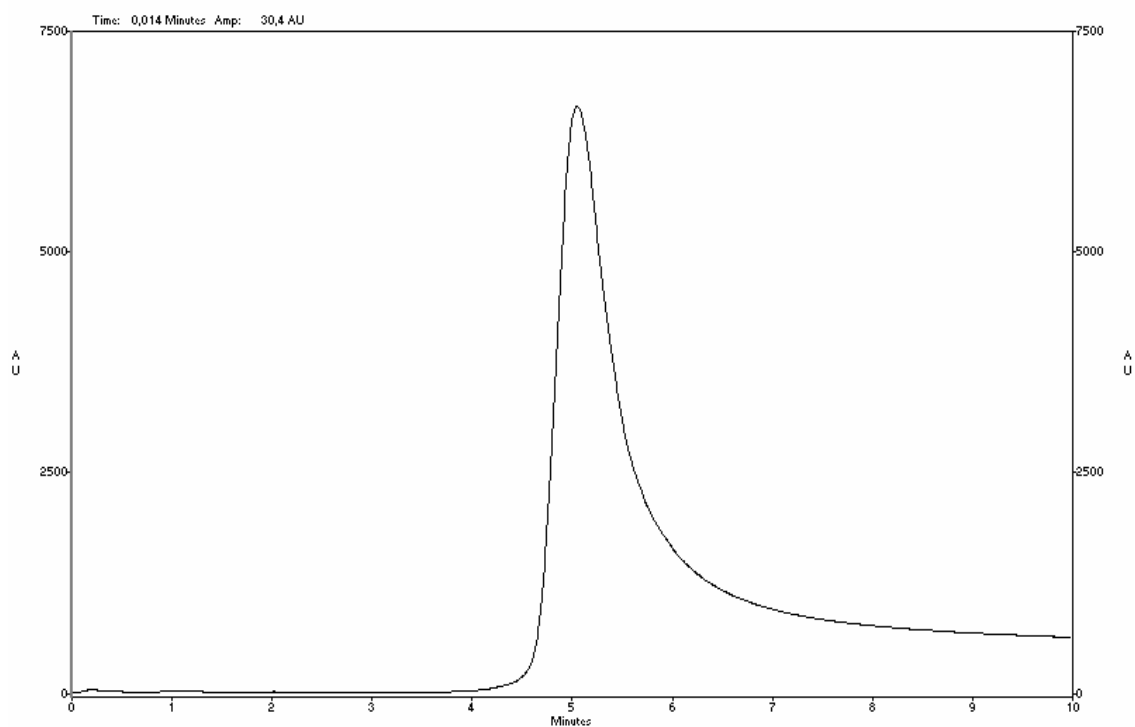
4.2 Test av HiTrap™ kolonnen og bytte til flyktig buffer

4.2.1 Albumin binding til HiTrap™ kolonnen ved bruk av 20mM Na₃PO₄

For å teste om albumin ble bundet og deretter eluert av HiTrap™ kolonnen ble BSA injisert på kolonnen (binding) og deretter eluert av med 2M NaCl i 20mM Na₃PO₄. Dette gav to topper (vist i figur 4.3 og 4.4). Toppen i figur 4.3 er injeksjonsfronten mens toppen i figur 4.4 er elueringsfasen som inneholder BSA. Den maksimale absorbansen dersom proteinet ikke ble bundet på kolonnen ble testet ved å injisere BSA uten kolonne. Dette eksperimentet ble utført med to ulike konsentrasjoner 0,1mg/ml og 1 mg/ml. Lave konsentrasjoner av BSA ble valgt for å ligge innenfor deteksjonsområdet for UV-detektoren ved vask av kolonnen. Selv ved disse konsentrasjonene var trolig absorbansen utenfor detektorens lineære område.



Figur 4.3: Injeksjon av 0,1mg/ml BSA i 20mM Na₃PO₄.



Figur 4.4: Elueringsfasen som inneholder BSA, mobilfase var 2M NaCl i 20mM Na₃PO₄.

For å få en indikasjon på om alt BSA kunne gjøres rede for, ble summen av arealet til toppen for injeksjon og eluering (figur 4.3 og 4.4) sammenlignet med arealet av en BSA injeksjon uten kolonne (n=1). Her ble det antatt at injeksjonsfrontens signal ble forårsaket av BSA. Som vist i tabell 4.3 tilsvarte disse arealene hverandre, med en forskjell på rundt $\pm 6\%$. Dette viser at alt BSA bindes til HiTrap™ kolonnen og at alt vaskes av i elueringsfasen.

Tabell 4.3: Arealer av topper på UV- kromatogram.

BSA-konsentrasjon	Areal under toppene				Differanse mellom c og d (% i forhold til d)
	Injeksjons front (a)	Vask av kolonnen (b)	Sum av a og b (c)	BSA uten kolonne (d)	
1,0 mg/ml i 20mM Na ₃ PO ₄	1218305	11866243	13084548	12349400	5,9 %
0,1 mg/ml i 20mM Na ₃ PO ₄	205475	1312788	1518263	1621166	-6,3 %

4.2.2 Bytte til flyktig buffer

Et viktig moment i oppgaven var å finne en egnet flyktig buffer som i tillegg var MS-kompatibel, siden eluentene fra HiTrap™ kolonnen skal analyseres på LC-MS.

NH₄Ac er både flyktig og MS-kompatibel og ble derfor prøvd ut som bindingsbuffer i stedet for 20mM Na₃PO₄.

50mM NH₄Ac ble brukt. Grunnen til at den molare bufferkonsentrasjonen ble økt var at ionestyrken for 20mM NH₄Ac ($20 \cdot 10^{-3}$) var lavere enn for 20mM Na₃PO₄ ($55 \cdot 10^{-3}$) ved pH 7. Forsøket i kapittel 4.2.1, ble repetert, men kun for 1mg/ml BSA (n=1). Tabell 4.4 viser topphøydene. Toppene er høyere enn dem som ble vist i tabell 4.3. Årsaken til dette er at bølgelengden ble endret fra 254 nm til 280 nm hvor BSA viser høyere absorbanse. Sum av arealene for vask og injeksjon av BSA og injeksjon uten kolonne er like, med en differanse på under 5%. Dette er sammenlignbart med eksperimentene hvor 20mM Na₃PO₄ ble brukt som mobilfase, beskrevet under 4.2.1.

Tabell 4.4: Arealet av topper i UV-kromatogram.

BSA-konsentrasjon	Arealet under toppene				Differanse mellom a og b (% i forhold til b)
	Injeksjons front	Vask av kolonnen	Sum at arealene for injeksjon og vask (a)	BSA injeksjon uten kolonne (b)	
1 mg/ml i 50mM NH ₄ Ac	1215681	27843368	26756096	27971777	4,35

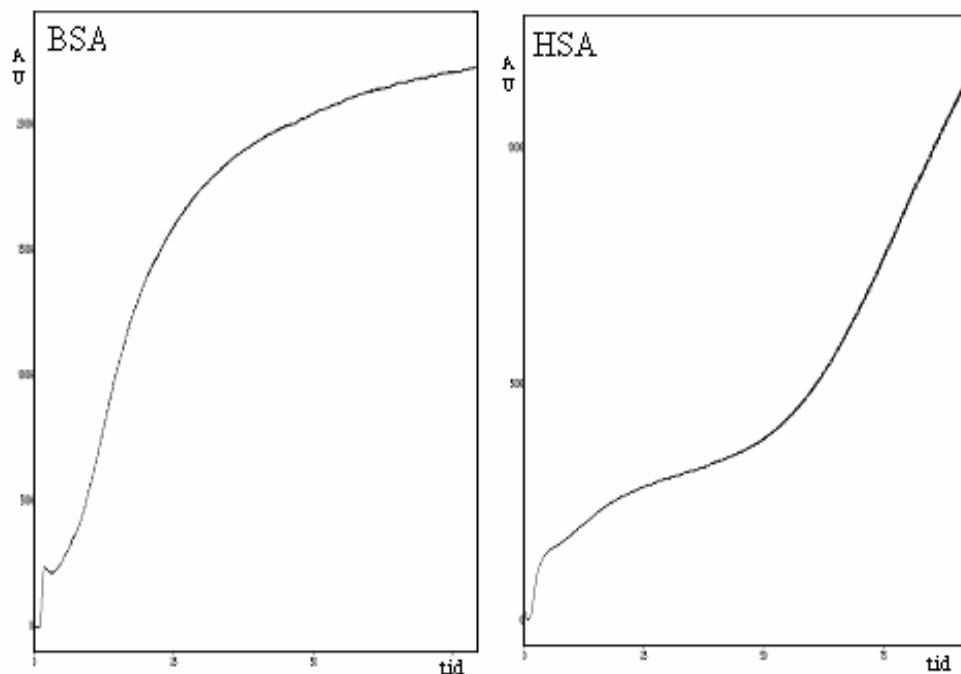
På grunn av at forsøkene i kapittel 4.2 ble utført med bare en parallell, kan ikke andre klare konklusjoner trekkes. Forsøkene gav likevel et utgangspunkt for det videre arbeidet med HiTrap™ kolonnen, ved å gi en indikasjon på at 50mM NH₄Ac kunne brukes som bindingsbuffer i stedet for 20mM Na₃PO₄.

4.3 Kapasitet av HSA på HiTrap™ kolonnen

4.3.1 Bytte fra BSA til HSA

For å teste bindingskapasiteten på kolonnen ble det først brukt 20mM Na₃PO₄, som var anbefalt bindingsbuffer fra Amersham Biosciences (*AmershamBiosciences 12.06.2005*).

En 0,3mg/ml 20mM Na₃PO₄ BSA løsning ble pumpet kontinuerlig på HiTrap™ kolonnen med en flow på 1ml/min. UV absorbans ved 280 nm ble monitorert. Kurven for bindingskapasiteten ble bratt allerede etter noen få minutter (figur 4.5 til venstre), noe som tyder på veldig lav bindingskapasitet. Ved hjelp av litteratur ble det funnet at andre serumalbuminer enn HSA trolig bindes svakere til liganden på HiTrap™ kolonnen (Peters 1996). Målet er at kolonnen skal kunne brukes som prøveopparbeidelse på humane prøver. BSA ble derfor byttet ut med HSA.



Figur 4.5: Bindingskapasitetskurve for BSA og HSA.

Bindingskapasiteten for kolonnen ble nå testet med 0,25mg/ml HSA løst i 20mM Na_3PO_4 satt kontinuerlig på kolonnen med en flow på 1ml/min. Som vist i figur 4.5 til høyre, nådde kurven etter få minutter et platå med svak stigningsgrad. Etter omtrent 50 minutter ble kurven brattere. Platået i kurven kan igjen tyde på gjennombrudd av HSA ved prøvepåsetting, selv ved lave konsentrasjoner. Den bratte delen av HSA kurven ligger betraktelig lenger mot høyre enn den for BSA. Dette viser at bindingskapasiteten av HSA er høyere enn for BSA på HiTrap™ kolonnen.

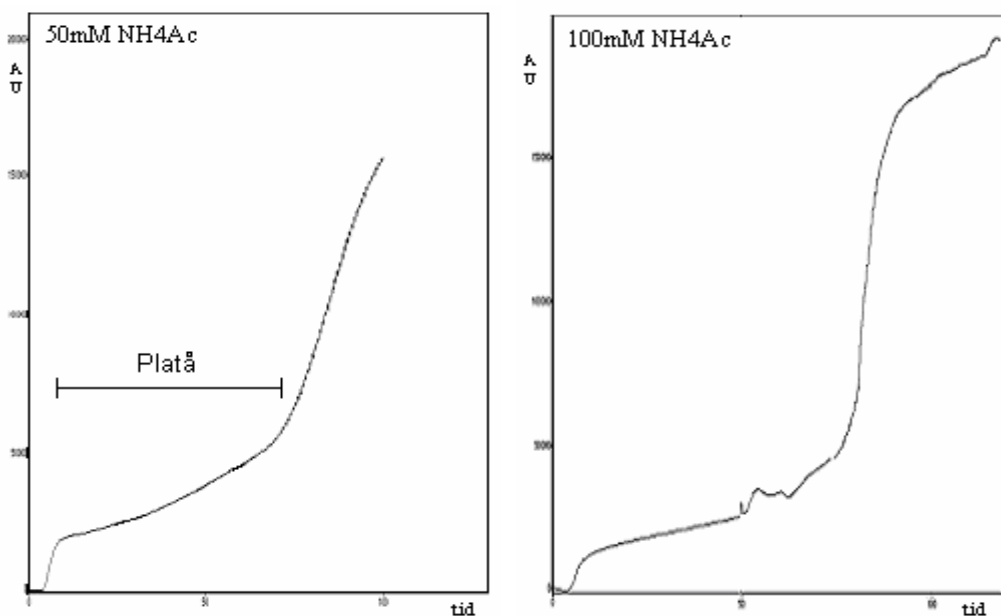
Selv om HSA og BSA hadde ulik bindingskapasitet, ble ikke forsøkene i 4.2 utført på ny med HSA. Årsaken til dette var at målet i kapittel 4.2 var å se at kolonnen fungerer, ikke hvor godt. Forsøkene med BSA viser at kolonnen har ønsket effekt, den binder serumalbumin. Siden liganden binder HSA bedre enn BSA, ville trolig forsøkene gitt et lavere gjennombrudd ved injeksjon av prøven dersom det ble forsøkt med HSA i stedet.

4.3.2 Utvikling av metoden for å teste bindingskapasitet

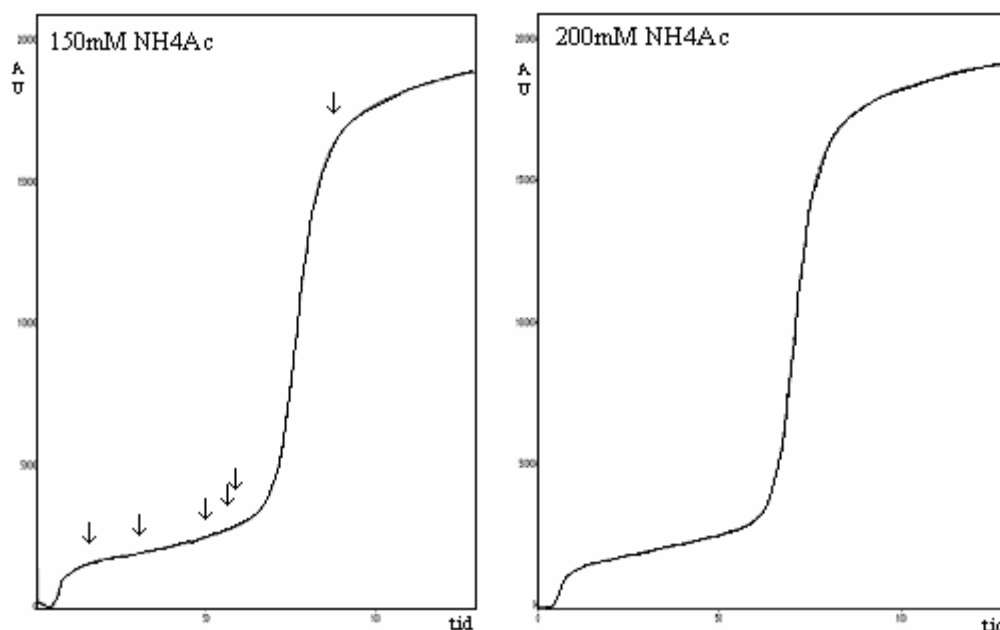
50mM NH_4Ac ble brukt for å teste bindingskapasiteten av HSA på HiTrap™ kolonnen siden resultatene i 4.2.2 indikerte at denne bufferen kunne fungere som bindingsbuffer i stedet for 20mM Na_3PO_4 .

Etter søk i litteraturen ble det klart at bindingskinetikken påvirkes av flowhastigheten over kolonnen (*Fahrner and Blank 1999*). Ved høyere flow, bindes HSA bare på de lettest tilgjengelige setene før gjennombrudd er et faktum. Flowhastigheten ble derfor senket til 0,16ml/min slik at HSA skulle få tid til å diffundere utover hele kolonnematerialet. Dette viste seg å gi en bedret kinetikk og økt bindingskapasitet i forhold til de innledende forsøkene. For å kunne ta opp kurvene innenfor et rimelig tidsintervall, ble konsentrasjonen av HSA økt til 2,5mg/ml når flowhastigheten ble senket.

Bindingskurver ble tatt opp for 2,5mg/ml HSA løst i NH_4Ac i konsentrasjonene 50mM, 100mM, 150mM og 200mM (figur 4.6 og 4.7). Dette ble gjort for å finne den bufferkonsentrasjonen som gav best bindingskapasitet og kinetikk.



Figur 4.6: Bindingskapasitetskurve for 2,5mg/ml HSA i 50mM NH_4Ac (venstre) og 100mM NH_4Ac * (høyre). *Kurven er satt sammen av to kromatogram på grunn av at pumpe måtte skiftes midt i opparbeidelsen.



Figur 4.7: Bindingskapasitetskurve for HSA i 150mM NH₄Ac (venstre) og 200mM NH₄Ac (høyre). Pilene indikerer hvor prøver ble tatt ut for å bekrefte gjennombrudd av HSA (se 4.3.3).

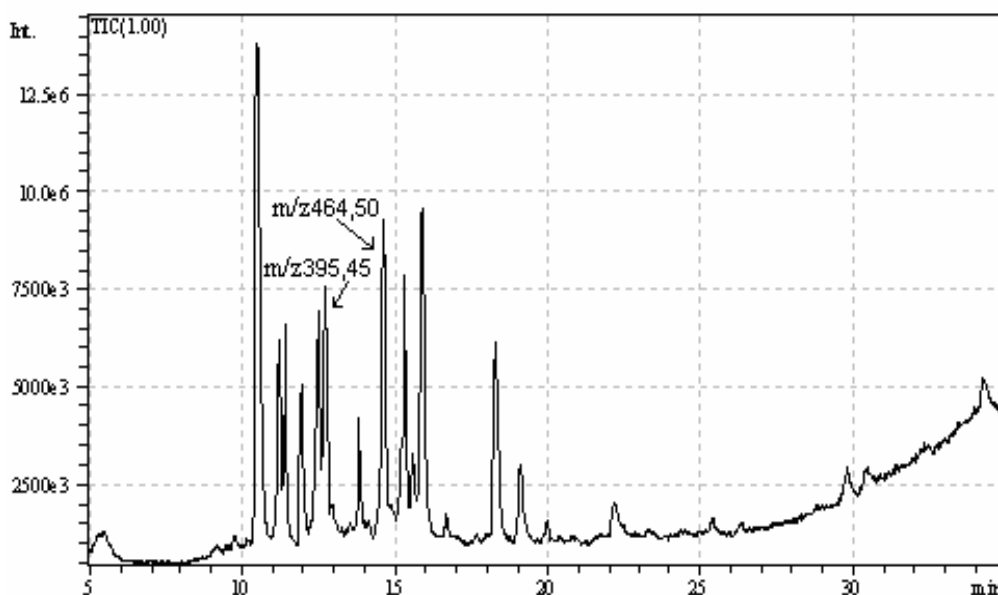
Kurven for 50mM NH₄Ac ble noe annerledes enn de tre andre. Plataet (se figur 4.6) hadde en høyere stigningsgrad, mens den bratte delen hadde en lavere stigningsgrad enn de tre andre bindingskurvene. Dette tyder på en dårligere bindingskinetikk (*Fahrner and Blank 1999*). 50mM NH₄Ac ble derfor ikke brukt videre.

Kurvene for 100-200mM NH₄Ac viste et platå med lav stigningsgrad for deretter å stige bratt mot 100% gjennombrudd. Både 150 og 200mM NH₄Ac som bindingsbuffer viser sammenlignbare kapasitetskurver. Det ble valgt å jobbe videre med 150mM NH₄Ac, selv om ionestyrken av 150mM NH₄Ac ($150 \cdot 10^{-3}$) var nesten tre ganger høyere enn den til 20mM Na₃PO₄. Ionestyrken er likevel mye lavere enn ionestyrken til 2M NaCl i 20mM Na₃PO₄ (2,055) som brukes ved eluering av HSA.

4.3.3 Gjennombrudd av HSA

Gjennom forsøkene over ble det antydnet at ikke alt injisert HSA bindes til kolonnen, selv når absoluttmengden er lavere enn kolonnens teoretiske bindingskapasitet (16-20mg). For å prøve å bekrefte eller avkrefte om gjennombruddsignalet skyltes HSA, ble det gjort en bindingskapasitetsanalyse for 2,5mg/ml HSA løst i 150mM NH_4Ac hvor det ble tatt ut fraksjoner på et minutt. Den første fraksjonen ble samlet fra 15. til 16. minutt etter at pumpen ble startet, de andre etter 30, 50, 56, 58,7 og 87,9 minutter (se figur 4.7). Mobilfasens hastighet var på 0,16ml/min.

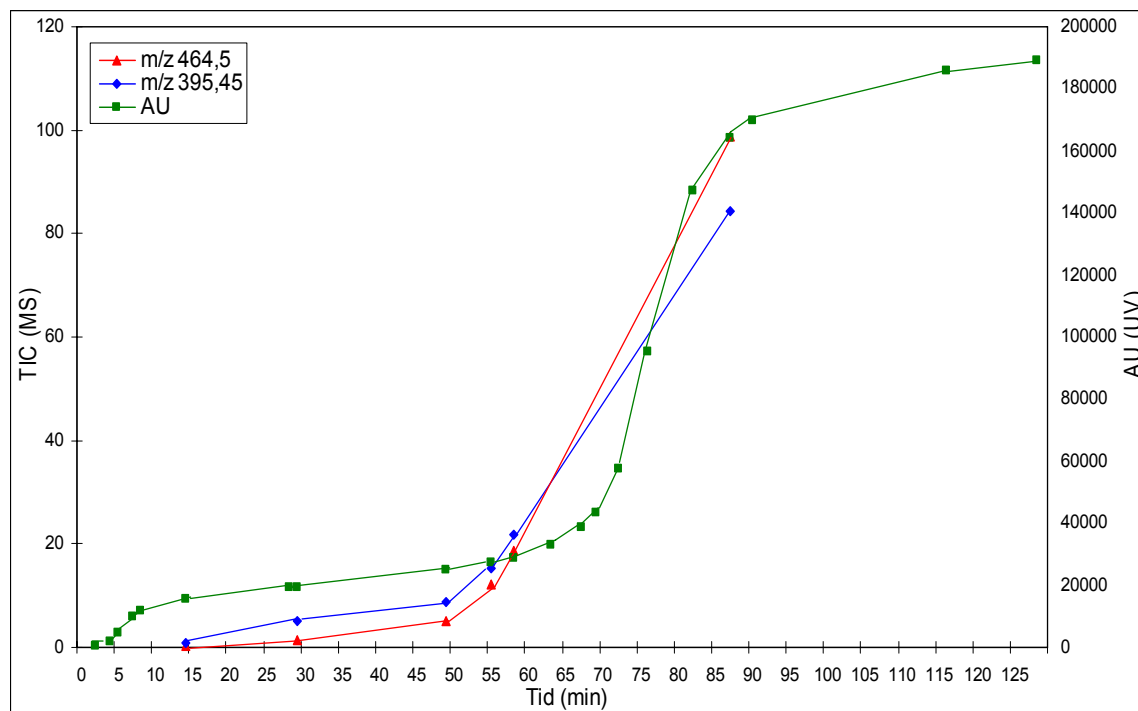
Som beskrevet tidligere er det av flere grunner vanskelig å detektere hele proteiner ved hjelp av LC-MS (kapittel 2.7). Fraksjonene med HSA ble derfor klippet opp ved hjelp av trypsin før analyse på LC-MS. Disse resultatene ble sammenlignet med et tryptisk klipp av en referanse på 2,5mg/ml HSA. Et typisk kromatogram av HSA (2,5mg/ml) klippet med trypsin er vist i figur 4.8. De ulike toppene er produktene fra det tryptiske klippet.



Figur 4.8: LC-MS kromatogram for produktene etter tryptisk klipp av 2,5mg/ml HSA, tatt opp med fullt sveip fra 250m/z til 500m/z. Toppene for m/z 464,50 og 395,45 er angitt med piler.

For å kunne sammenligne standardprøvene med fraksjonene fra HiTrap™ kolonnen ble det antatt at klippingen var uavhengig av HSA konsentrasjonen og at reaksjonen for alle

fraksjonene gikk like langt i løpet av 22 timer. To produkter (m/z 464,5 og m/z 395,45) ble utvalgt som var representative for klippet i alle prøvene (se figur 4.8).

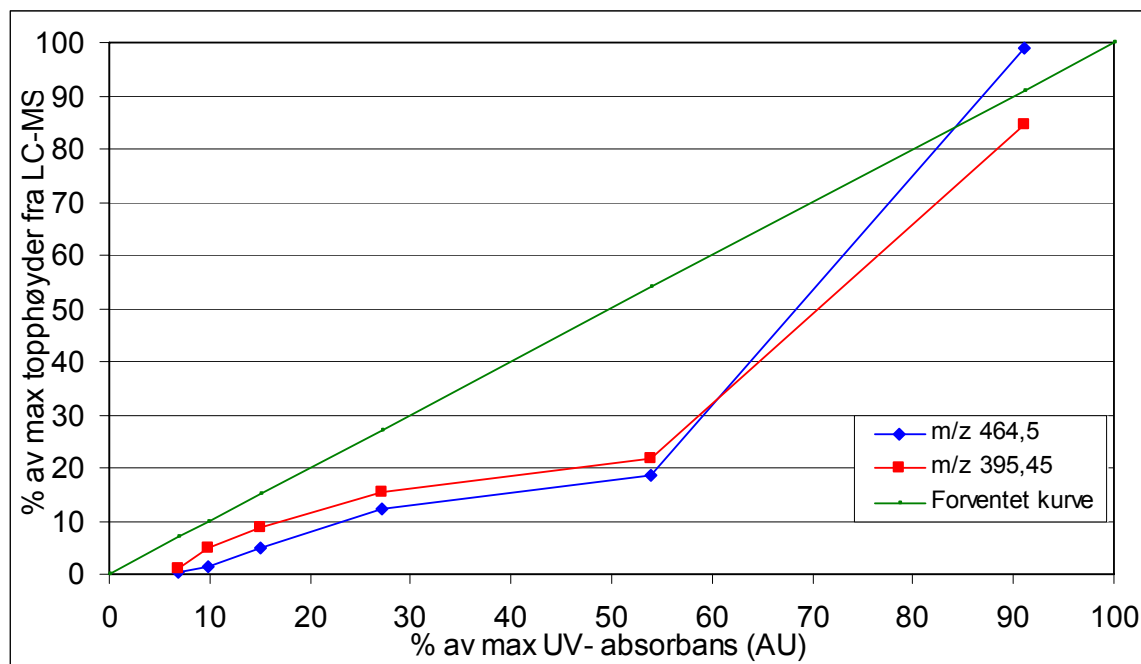


Figur 4.9: Kapasitetskurve for 2,5mg/ml HSA løst i 150mM NH₄Ac (■), med prosentvis gjennombrudd av HSA detektert på LC-MS (m/z 464,5 og m/z 395,45).

I figur 4.9 er kapasitetskurven (tatt opp med UV detektor ved 280 nm) for 2,5mg/ml HSA i 150mM NH₄Ac på HiTrap™ kolonnen tegnet inn, sammen med topphøydene for to produkter etter tryptisk klipp av HSA (m/z 464,5 og m/z 395,45). Kurvene for de to produktene av HSA gjenspeiler konsentrasjonen av HSA i de ulike fraksjonene. Som kurvene viser var det gjennombrudd av HSA på HiTrap™ kolonnen før den teoretiske bindingskapasiteten på 16- 20 mg HSA var nådd. (Når konsentrasjonen av HSA er 2,5mg/ml og flowhastigheten på 0,15ml/min, tilsvarer 16 mg på kolonnen ca 43 minutter, mens 20mg tilsvarer ca 53 minutter). Dette kan forklares med at 98% av injisert HSA blir bundet av liganden ved injeksjon (*Peters 1996*).

For å finne ut om hele gjennombruddssignalet skyldes HSA ble det laget en kurve hvor prosentvis topphøyder fra LC-MS ble plottet mot prosentvis absorbans fra UV-detektoren. For å finne absorbansen tilsvarende 100% gjennombrudd ble 2,5mg/ml HSA

detektert uten kolonne. I LC-MS ble topphøydene til produktene av 2,5mg/ml HSA satt til 100%. Kurven er vist i figur 4.10.



Figur 4.10: Prosentvise topphøyder for to HSA- produkter analysert på LC-MS, mot prosentvis UV-absorbans. Den forventede kurven i forhold til den teoretiske konsentrasjonen også tegnet inn.

Dersom HSA alene hadde forårsaket UV absorbansen ville kurven blitt lineær. Signalet ble stort sett lavere enn den forventede kurven og kan derfor ikke skyldes gjennombrudd av HSA alene. Hva som ellers gir UV- absorbans er usikkert. Denne problemstillingen ble ikke undersøkt videre på grunn av at dette ble ansett som mindre viktig for det videre arbeidet med oppgaven.

En feilkilde i forsøket var at absorbansen for 2,5mg/ml HSA (100%) trolig var utenfor det lineære området for UV detektoren. Signalet ble derfor for lavt i forhold til hva som var forventet ut fra konsentrasjonen. På grunn av dette vil prosentandelene for de første fem prøvene være for høye i forhold til hvor stort gjennombruddet egentlig var. Avviket fra den forventede kurven angitt i figur 4.10, var derfor større enn det som kommer frem fra figuren. Prøven tatt ut etter 87,9 minutter ligger også utenfor det lineære området. Prosentandelen her blir derfor mer korrekt, men sannsynligvis noe for høy likevel.

Resultatene i dette kapittelet viser at det blir et gjennombrudd av HSA på HiTrap™ kolonnen. De viser også at det er noe annet enn HSA i eluatet som bidrar til absorbansen ved 280nm.

4.3.4 Bindingskapasitet

Bindingskapasiteten av HSA på HiTrap™ kolonnen kan defineres som mengde protein som kan bindes på kolonnen før vi får et visst gjennombrudd i prosent.

Ved hjelp av verdiene i tabell 4.5 kan bindingskapasiteten for kolonnen reknes ut. Dersom et gjennombrudd på 10% er akseptabelt vil bindingskapasitet være nådd etter litt over 50 minutter. Dette gir en bindingskapasitet på minst $0,16\text{ml/min} \cdot 50\text{min} \cdot 2,5\text{mg/ml} = 20\text{ mg}$. For et gjennombrudd på 5%, vil bindingskapasiteten være nådd etter omtrent 30 minutter eller 12mg.

Tabell 4.5: Gjennombrudd av HSA på HiTrap™ kolonnen.

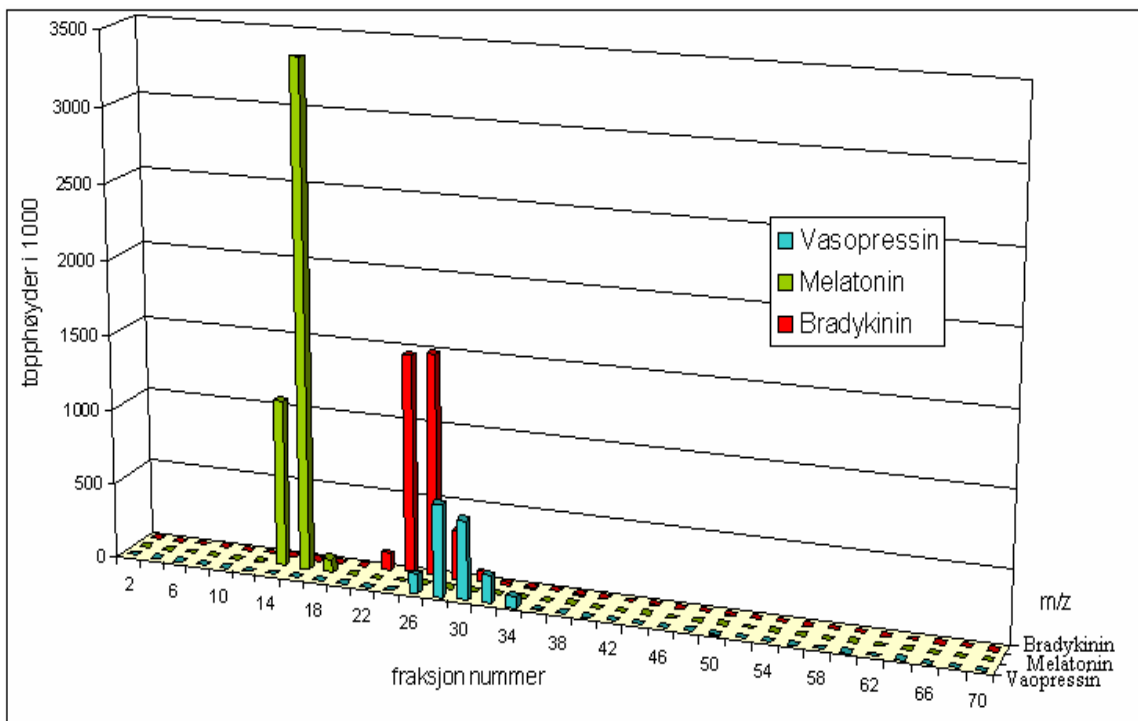
HSA- produkt	Gjennombrudd for prøvene tatt ut etter ulikt antall minutter					
	15	30	50	56	58,7	87,9
464,5m/z	0,3 %	1,4 %	4,9 %	12,2 %	18,6 %	98,9 %
395,45m/z	0,9 %	5,1 %	8,7 %	15,3 %	21,9 %	84,4 %

Et gjennombrudd på 5% er tidligere blitt brukt ved utregning av bindingskapasitet (*Fahrner and Blank 1999*). Dette betyr at nesten 12mg HSA kan injiseres per kolonne. Serum inneholder veldig store konsentrasjoner HSA. Normalkonsentrasjon hos voksne mennesker er $42 \pm 3,5\text{mg/ml}$ (*Peters 1996*). Fire HiTrap™ kolonner på 1ml må kobles i serie for å fjerne alt HSA i 1 ml serum med et gjennombrudd på 5%.

4.4 Modellsustanser på HiTrap™ kolonnen

4.4.1 Eluering av peptidhormonene fra HiTrap™ kolonnen

Vasopressin, melatonin og bradykinin (5 µg/ml) ble brukt som modellsustanser i dette forsøket. Siden det ikke ble funnet lignende forsøk i litteratur, ble en høy konsentrasjonen valgt på bakgrunn av ønsket om å kunne detektere peptidhormonene selv om de ble minimalt eluert eller eluert over et stort område. Det var viktig å finne ut når peptidhormonene ble eluert ut fra HiTrap™ kolonnen for å kunne ta fraksjon i senere analyser. Dette ble gjort ved å kontinuerlig ta fraksjoner på to minutter i til sammen 70 minutter. Disse ble analysert på LC-MS. Det ble funnet at modellsustansene ble eluert mellom 12 og 40 minutter, med noe forskjellig retensjonstid som vist i figur 4.11. De ulike retensjonstidene tyder på en interaksjon med kolonnematerialet.



Figur 4.11: Elueringstidspunkt for peptidhormonene fra HiTrap™ kolonnen. Hver fraksjon tilsvarer ett minutt. 10mg/ml HSA ble injisert etter fraksjon nummer 42.

4.4.2 *Uspesifikk binding av peptidhormonene til HiTrap™ kolonnen*

For å bestemme den uspesifikke bindingen på kolonnen ble det brukt to ulike konsentrasjoner peptidhormoner (melatonin, bradykinin og vasopressin). Dette var 5µg/ml og 500ng/ml. 5µg/ml ble brukt i innledende for å teste metoden. Fordi den uspesifikke bindingen av peptidhormonene ikke er detekterbar ved høye konsentrasjoner dersom det er en absolutt mengde som bindes til HiTrap™ kolonnen, ble konsentrasjonen senket til 500ng/ml. Ved denne konsentrasjonen var det fortsatt ikke nødvendig med oppkonsentrering mellom opparbeidelsen på HiTrap™ kolonnen og analyse på LC-MS.

Hele mengden av eluerte peptidhormoner ble tatt opp i én fraksjon. På bakgrunn av resultatene under 4.4.1 ble denne tatt ut som 27,3 ml (til 41,7 minutter) etter at 1,5 ml (10 minutter) var pumpet over kolonnen. Prøvene på 5µg/ml eller 500ng/ml peptidhormoner ble injisert på HiTrap™ kolonnen. Standardprøver til å sammenligne topphøydene med, ble analysert på LC-MS før og etter analysene av fraksjonene. For 5µg/ml ble to prøver opparbeidet på HiTrap™ kolonnen, mens det for 500ng/ml ble opparbeidet tre prøver. Disse ble analysert med to ganger hver på LCMS. Prøvene til injeksjon på HiTrap™ kolonnen og til bruk som standard i LC-MS ble tatt ut fra samme beholder.

Den prosentvise nedgang i topphøyder for peptidhormonene ved opparbeidelse på HiTrap™ kolonnen er vist i tabell 4.6. For å se om nedgangen var signifikant, ble analyseresultatene fra LC-MS for prøvene og standardene (analysert på samme dag), sammenlignet ved hjelp av en t-test. Siden nedgang var det viktigste i denne sammenheng ble det valgt å teste resultatene ensidig. Det ble derfor ikke sett bort fra fortegnene til t-verdiene. Resultatene fra t-testen er vist i parentes i tabell 4.6. Det ble valgt å teste resultatene med et statistisk signifikansnivå på 95%. Dette gir 5 % sannsynlighet ($p=0,05$) for å feilaktig konkludere med at resultatene er forskjellige selv om de i virkeligheten er like.

Tabell 4.6: Forskjeller i topphøyder for peptidhormonene opparbeidet på HiTrap™ kolonnen (N_p) sammenlignet med standardprøver (N_s). Resultater fra t-testen er vist i parentes. De uthevede t-verdiene viser signifikant nedgang i peptidhormonenes topphøyder.

Konsentrasjon	Peptidhormon			MS analyser		Frihetsgrader $n=(N_p + N_s)-2$	Kritisk verdi 95%
	VP	MT	BK	N_p	N_s		
500ng/ml	-22,4 % (8,73)	-7,7 % (2,71)	-27,6 % (7,32)	6	6	10	2,23
5µg/ml	18,7 % (-2,22)	-1,1 % (2,19)	17,6 % (-0,10)	4	4	6	2,45

Tabell 4.6 viser at det var en økning i konsentrasjon for vasopressin og bradykinin når 5µg/ml ble injisert på HiTrap™ kolonnen. Hva dette skyldes ble ikke undersøkt nærmere. Det ble i disse tilfellene bare konkludert med at det ikke var noen detekterbar binding til kolonnen. Det var ingen signifikant nedgang i konsentrasjonen for melatonin (5µg/ml).

For 500ng/ml var det som vist i tabell 4.6 en signifikant nedgang for både vasopressin, melatonin og bradykinin på mellom 7,7 og 27,6%.

Forsøket viser at det er uspesifikk binding på kolonnen for en konsentrasjon på 500 ng/ml av peptidhormonene. Trolig er det en absolutt mengde av peptidhormonene som bindes til kolonnen, slik at nedgangen blir ubetydelig når de injiseres i så høye konsentrasjoner som 5µg/ml.

Den uspesifikke bindingen på HiTrap™ kolonnen ble forsøkt brutt ved å injisere 10mg/ml HSA 42 minutter etter injeksjon av melatonin, vasopressin og bradykinin (etter at peptidhormonene var eluert). Ingen detekterbare mengder av peptidhormonene ble eluertsom følge av HSA injeksjonen. Denne konsentrasjonen av HSA var trolig ikke nok til å mette kolonnen slik at peptidhormonene ble utkonkurrert. Fokus i denne oppgaven var å bryte binding mellom HSA og peptider. Metoder for å bryte den uspesifikke bindingen til HiTrap™ kolonnen ble derfor ikke undersøkt nærmere.

4.5 HSA injisert sammen med peptidhormonene på HiTrap™ kolonnen

Et moment i denne oppgaven var å prøve å bryte bindingen mellom HSA og modellsubstansene. Derfor var det viktig å kunne vise at peptidhormonene ble bundet til HSA. 500ng/ml og 5µg/ml peptidhormoner ble blandet med 10mg/ml HSA og satt ved romtemperatur i 22 timer. Videre ble prøvene opparbeidet på HiTrap™ kolonnen for å fjerne HSA, og dermed også den mengden peptidhormoner som ble bundet til proteinet. En fraksjon på 27,3ml ble tatt under opparbeidelsen etter at 1,5ml var pumpet over HiTrap™ kolonnen. Innholdet av peptidhormoner i denne ble bestemt ved hjelp av LC-MS og sammenlignet med standardprøver (analysert på samme dag). Det ble opparbeidet to prøver for begge konsentrasjonene (5µg/ml og 500ng/ml) av peptidhormoner på HiTrap™ kolonnen som hver ble analysert to ganger på LC-MS.

Tabell 4.7 viser den prosentvise nedgangen i topphøyder for peptidhormonene i forhold til standardprøvene. De negative prosentene viser nedgang som følge av peptidhormonenes binding til HSA og til HiTrap™ kolonnen. For å finne ut om nedgangen var signifikant det utført en ensidig t-test (se 4.4.2). Tabell 4.7 viser t-verdiene i parentes. De t-verdiene som var signifikante er uthevet.

Tabell 4.7: Forskjeller i topphøyder for peptidhormonene opparbeidet sammen med HSA på HiTrap™ kolonnen (N_p) sammenlignet med standardprøver (N_s). Resultater fra t-testen er vist i parentes, hvor de signifikante er uthevet.

Konsentrasjon	Peptidhormon			MS analyser		Frihetsgrader $n=(N_p + N_s)-2$	Kritisk verdi 95%
	VP	M	BK	N_p	N_s		
500ng/ml	3,7 % (-1,83)	-25,1 % (9,04)	-79,5 % (46,71)	4	4	6	2,45
5µg/ml	-13,0 % (3,49)	-9,9 % (2,23)	-30,4 % (9,4)	4	4	6	2,45

Vasopressin (5µg/ml), melatonin (500ng/ml) og bradykinin (500ng/ml og 5µg/ml) viste en signifikant nedgang i konsentrasjon når peptidhormonene ble blandet med HSA før opparbeidelse på HiTrap™ kolonnen. Nedgangen i konsentrasjon for 5µg/ml melatonin var ikke signifikant. Men tendensen var likevel at peptidhormonet ble bundet til HSA.

Årsaken til at vasopressin (500ng/ml) viser en prosentvis økning i konsentrasjon er sannsynligvis fordi målingene er beheftet med feil. I forsøket om uspesifikk binding viste vasopressin (500ng/ml) 22,4% signifikant nedgang. Dette burde komme frem også i tabell 4.7. I tillegg er nedgangen i konsentrasjonen når 5mg/ml vasopressin injiseres på HiTrap™ kolonnen sammen med HSA er vist (med signifikans) og det er lite sannsynlig at dette ikke er tilfellet også for 500ng/ml vasopressin.

For å kunne vurdere om nedgangen i peptidhormonenes konsentrasjoner var på grunn av uspesifikk binding på kolonnen til HSA, ble prosentene i tabell 4.6 og 4.7. sammenlignet. Grunnen til at LC-MS resultatene ikke ble sammenlignet direkte var dag til dag variasjoner i analysemetoden.

Nedgangen i konsentrasjon var større når HSA blir blandet med peptidhormonene før injeksjon på HiTrap™ kolonnen (med unntak av 500ng/ml vasopressin som forklart sannsynligvis var beheftet med feil) enn når peptidhormonene ble injisert alene. Dette viser at peptidhormonene bindes til HSA i tillegg til den uspesifikke bindingen til HiTrap™ kolonnen.

4.6 Bryting av peptidhormonenes binding til HSA

4.6.1 Test av toleranse

For å bryte bindingen mellom peptidhormonene og HSA var det aktuelt å tilsette et løsemiddel i mobilfasen ved injeksjon av prøve. Etanol, metanol, ACN og 1-propanol (*Liu, Sabus et al. 2002*) var aktuelle til dette formålet.

HiTrap™ kolonnen tåler 20% etanol (*AmershamBiosciences 13.06.2005*). De andre løsemidlene er ikke testet på kolonnen av produsenten. Det ble derfor gjennomført et lite forsøk på hva kolonnen kunne tåle. Opp til 20% av metanol, ACN og 1-propanol ble pumpet over kolonnen i 60 minutter. Eventuelle endringer i kolonnematerialet ble detektert visuelt med og uten mikroskop.

Dersom noen av disse løsemidlene skal brukes i den ferdig utviklede metoden, vil det være viktig å teste kolonnens stabilitet over tid. Forsøket gjort i denne oppgaven tar ikke hensyn til eventuelle endringer i kolonnen som ikke kan detekteres visuelt. Likevel var dette et godt nok forsøk i dette tilfellet, da målet var å få en indikasjon på hvilke løsemidler som kunne være aktuelle.

For både metanol og ACN ble det observert dannelse av bobler i pakkematerialet. Det ble derfor konkludert at disse løsemidlene ikke burde brukes videre. For 1-propanol ble ingen endringer observert. Etanol og 1-propanol ble derfor brukt videre i forsøkene med å bryte bindingen mellom HSA og modellsubstansene

4.6.2 Bryting av bindingen mellom HSA og peptidhormonene

10% etanol og 10% 1-propanol i 150mM NH_4Ac ble brukt i hver sine forsøk som mobilfase for å bryte bindingen mellom HSA og peptidhormonene. Prøvene som ble injisert på HiTrap™ kolonnen var 500ng/ml peptidhormoner sammen med 10mg/ml HSA. Det ble utført tre forsøk med 10% etanol i mobilfasen og to forsøk med 10% 1-propanol. Alle prøvene ble etter opparbeidelse på HiTrap™ kolonnen analysert to ganger på LC-MS sammen med standardprøver.

De prosentvise endringene i topphøyder for peptidhormonene opparbeidet på HiTrap™ kolonnen med 10% etanol eller 10% 1-propanol tilsatt mobilfasen er vist i tabell 4.9. For å se om endringene i konsentrasjonene for peptidhormonene var signifikante ble det utført ensidige t-tester der topphøydene for de opparbeidede prøvene ble sammenlignet med topphøyder for standardprøver. Denne statistiske testen er nærmere beskrevet under 4.4.2.

Tabell 4.9: Forskjeller i topphøydene for peptidhormonene opparbeidet sammen med HSA på HiTrap™ kolonnen med 10% løsemiddel i mobilfasen (N_p) sammenlignet med standardprøver (N_s). Resultater fra t-testen er vist i parentes, hvor de uthevede viser signifikans.

Løsemiddel i NH_4AC	Peptidhormon			MS analyser		Frihetsgrader $N=(N_p + N_s)-2$	Kritisk verdi 95%
	VP	M	BK	N_p	N_s		
10% etanol	19,6 % (-8,93)	-5,4 % (1,04)	-85,6 (47,56)	6	5	9	2,26
10% 1-propanol	6,6 % (-2,78)	-8,9 (2,06)	-86,0 (30,07)	4	4	6	2,45

For vasopressin og melatonin var det ingen signifikant nedgang i topphøyde når 10% etanol eller 10% 1-propanol i 150mM NH_4Ac ble brukt som mobilfase på HiTrap™ kolonnen. Dette viser at bindingen til HSA og til HiTrap™ kolonnen ble brutt. Vasopressin viste derimot en økning i topphøyde. Grunnen til dette er ukjent og ble heller ikke undersøkt nærmere i denne oppgaven på grunn av for lite tid.

Nedgangen i topphøyde for bradykinin ble prosentvis veldig stor, på over 85% for begge mobilfasene. Denne prosentandelen var tilsvarende nedgangen som følge av HSA binding. Økning i konsentrasjonen av 1-propanol fra 10% til 20% hadde ingen effekt. Kanskje 20% etanol i 150mM NH_4Ac ville hatt bedre effekt, men dette ble ikke undersøkt da tiden ikke strakk til. HSA bindingen ble ikke brutt for bradykinin.

Resultatene i dette kapittelet viser at 10% etanol eller 10% 1-propanol i 150mM NH_4Ac kan bryte bindingen mellom peptidhormoner og HSA i noen tilfeller.

4.7 Forsøk med produkter etter tryptisk klipp av cytokrom c

For å få testet HiTrap™ kolonnen med flere peptider i en mer kompleks prøve ble cytokrom c klippet opp og produktene fra det tryptiske klippet brukt i forsøkene som er beskrevet for peptidhormonene under kapitlene 4.4.2, 4.5 og 4.6.2. Dette var test av uspesifikk binding, test av binding til HSA og forsøk for å bryte bindingen til HSA. Alle de tre forsøkene ble gjort på samme dag for én cytokrom c prøve. Forsøksrekken ble repetert tre ulike dager og fortløpende analysert på LC-MS sammen med standardprøver.

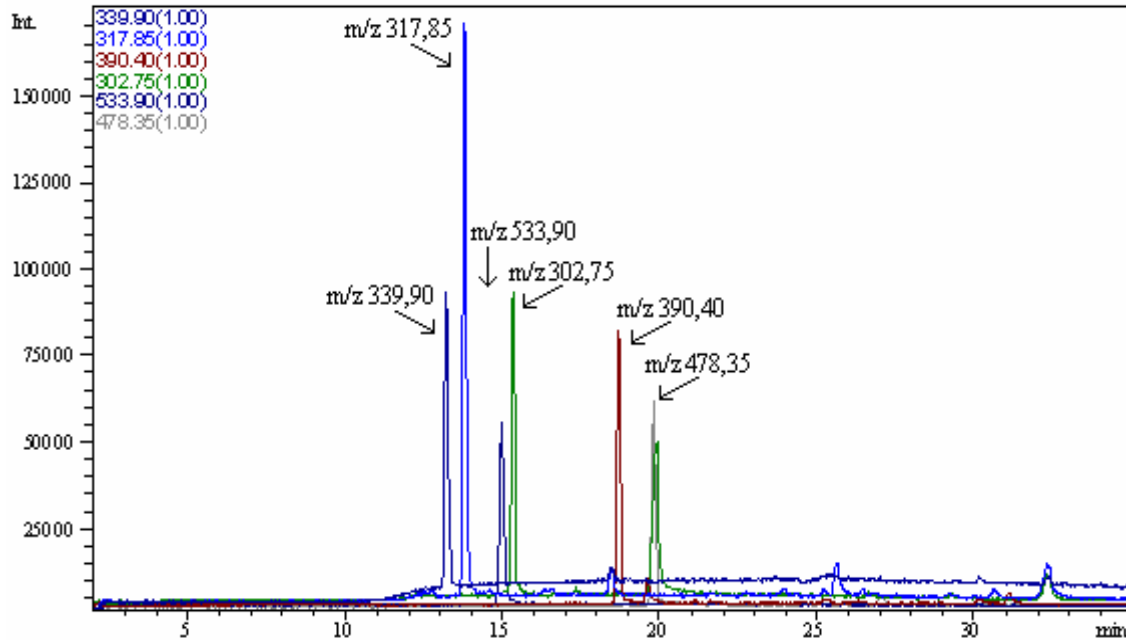
4.7.1 Produktene etter tryptisk klipp av cytokrom c

Cytokrom c og trypsin ble blandet i forholdet 1:20 og satt i varmeskap i 24 timer. Løsninger og fremgangsmåte er nærmere beskrevet under 3.4. Det ble dannet mange ulike produkter (peptider), som ble analysert på LC-MS med metoden beskrevet under 3.3.2. De peptidene som ble funnet å tilhøre cytokrom c fra hestehjertet (*UniversityOfCalifornia 13.06.2005*) og som ble brukt i de videre forsøkene er vist i tabell 4.11.

Tabell 4.11: Oversikt over detekterte peptider fra et tryptisk klipp av cytokrom c i LC-MS.

Peptider fra cytokrom c	Molekylærvækt (g/mol)	Detektert m/z-verdi	Gjennomsnittelig retensjonstid og RSD
YIPGTK	678,4	339,9	12,6 (0,7%)
IFVQK	634,4	317,85	13,3 (0,4%)
KTGQAPGFTYTDANK	1598,8	533,9	14,7 (0,2%)
GITWK	604,4	302,75	15,1 (0,3%)
MIFAGIK	779,4	390,4	18,7 (0,3%)
HKTGPNLHGLFGR	1433,8	478,35	19,9 (0,2%)

Gjennomsnittsretensjonstidene og RSD for disse er regnet ut for fire standardprøver (analysert samme dag). Et typisk kromatogram av peptidene som ble brukt videre er vist i figur 4.12.



Figur 4.12: SIM kromatogrammer for seks peptider etter tryptisk klipp av cytokrom c.

For å finne variansen i topphøydene for LC-MS analysen av peptidene, ble RSD i prosent for 4 standardprøver analysert på samme dag ble regnet ut. Disse oppgitt i tabell 4.12.

Tabell 4.12: RSD for topphøydene av peptidene (analysert på en dag).

m/z	339,9	317,85	533,9	302,75	390,4	478,35
RSD	13,7 %	11,1 %	7,9 %	9,5 %	11,4 %	4,2 %

RSD for peptidene etter tryptisk klipp av cytokrom c er større enn dem for melatonin, vasopressin og bradykinin. Metodene er ulike, men noe av forskjellen kan sannsynligvis også skyldes at prøvene i dette kapittelet er mer komplekse enn løsningene med peptidhormonene.

RSD for peptidenes topphøyder mellom ulike dager ble funnet for tre analyser av en standard på tre ulike dager. Verdiene er oppgitt i tabell 4.13.

Tabell 4.13: RSD for topphøydene av peptidene (mellom dager).

m/z	339,9	317,85	533,9	302,75	390,4	478,35
RSD	21,0 %	32,5 %	31,4 %	12,4 %	41,7 %	27,8 %

Med bakgrunn i den store variasjonen (tabell 4.13), ble det bestemt å ikke sammenligne prøver analysert på LC-MS ulike dager.

4.7.2 Test av HSA stabilitet

Før injeksjon på HiTrap™ kolonnen skulle noe av løsningen med peptider fra et tryptisk klipp av cytokrom c blandes med 10mg/ml HSA. For at HSA skulle ha tid til å binde peptidene skulle blandingen inkuberes i 20 timer ved romtemperatur. Fordi trypsin (fra klipp av cytokrom c) da ville være tilstede sammen med HSA, kunne det tenkes at HSA ble klippet i løpet av denne tiden.

For å teste HSA sin stabilitet i denne løsningen ble det laget to prøver. HSA og peptidene fra det tryptiske klippet av cytokrom c ble blandet i samme forhold som ved injeksjon på HiTrap™ kolonnen. Prøve A ble satt i kjøleskapet mens prøve B ble oppbevart ved romtemperatur.

Etter 22 timer ble prøvene fortynnet til en konsentrasjon på 366µg/ml HSA. Denne konsentrasjonen er tilsvarende den peptidene får etter opparbeidelse på HiTrap™ kolonnen. Deretter ble eventuelle produkter etter tryptisk klipp av HSA detektert ved hjelp av LC-MS. Som referanse ble det brukt en løsning med 250µg/ml trypsin klippet HSA.

Det ble ikke funnet noen m/z verdier som tilsvarte dem i referanseløsningen. Det ble derfor antatt at HSA ikke ble klippet av trypsin i prøveløsningen og dermed kunne blandes med peptidene fra cytokrom c som inneholdt rester av trypsin.

Årsaker til at HSA ikke ble klippet opp kan være mange. Trypsin har optimal enzymatisk effekt ved 37 °C. Når prøvene oppbevares under denne temperaturen er trypsinet mindre aktivt. Små endringer i pH har også innvirkning på proteasens effekt. Dessuten kan buffersammensetningen påvirke aktiviteten.

4.7.3 Test av uspesifikk binding til HiTrap™ kolonnen

Den uspesifikke bindingen av peptidene ble testet ved å sammenligne topphøydene etter opparbeidelse på HiTrap™ kolonnen med topphøyder for standardprøver (tatt ut fra samme beholder). De injiserte prøvene inneholdt 25µg/ml peptider fra et tryptisk klipp av cytokrom c. En fraksjon på 27,3ml ble tatt etter 1,5ml var pumpet over HiTrap™ kolonnen. Det ble antatt at peptidene fra et tryptisk klipp av cytokrom c ble eluert i samme område som peptidhormonene (se 4.4.2). Fraksjonene og standardene ble fortløpende analysert ved hjelp av LC-MS med metoden beskrevet under 3.3.2. Forsøkene på HiTrap™ kolonnen ble gjort med tre prøver på ulike dager.

Prosentandelene for hvor mye lavere topphøydene for peptidene ble etter opparbeidelse på HiTrap™ kolonnen er vist i tabell 4.14. For å finne om endringene var signifikante, ble det utført en ensidig t-test (se 4.4.2) hvor topphøydene i fraksjonene ble sammenlignet med standardprøver (t-verdiene er angitt i parentes).

Tabell 4.14: Prosentene viser den uspesifikke bindingen av peptidene på HiTrap™ kolonnen. T-verdiene fra t-testen av fraksjonene (N_p) mot standardprøver (N_s) er vist i parentes. De signifikante t-verdiene er uthevet.

nr	m/z	Peptider fra tryptisk klipp av cytokrom c						MS analyser		Frihetsgrad $n=(N_p + N_s)-2$	Kritisk verdi (95%)
		339,9	317,85	390,4	302,75	533,9	478,35	N_p	N_s		
1		43,8% (11,73)	39,9% (13,76)	23,4% (9,03)	29,4% (11,56)	41,0% (16,14)	39,7% (5,64)	3	3	4	2,78
2		56,5% (14,69)	54,0% (18,33)	12,0% (1,71)	50,4% (21,15)	50,7% (9,1)	42,1% (2,45)	3	3	4	2,78
3		56,7% (23,45)	55,5% (22,17)	18,3% (6,35)	51,4% (19,52)	52,5% (8,28)	52,4% (6,27)	3	3	4	2,78
Gj.snitt		52,0%	49,8%	17,9%	43,7%	48,1%	44,7%				

Tabell 4.14 viser en nedgang i peptidenes topphøyder etter opparbeidelse på HiTrap™ kolonnen som er signifikant i de fleste tilfellene. Nedgangen var på mellom 17,9 og 52,0% i gjennomsnitt.

Resultatene viser at peptidene fra et tryptisk klipp av cytokrom c har en uspesifikk binding på HiTrap™ kolonnen når 150mM NH_4Ac brukes som mobilfase.

4.7.4 Test av binding mellom HSA og produkter fra cytokrom c

For å teste HSA bindingen av peptidene, ble 25µg/ml peptider fra et tryptisk klipp av cytokrom c ble blandet med 10mg/ml HSA og satt ved romtemperatur i 20 timer. Prøven ble deretter injisert på HiTrap™ kolonnen med 150mM NH₄Ac som mobilfase. En fraksjon på 27,3ml ble tatt etter at 1,5ml var pumpet over kolonnen. Dette ble gjort tre ganger på ulike dager. Hver fraksjon ble analysert tre ganger på LC-MS.

Topp høydene i dette forsøket ble sammenlignet med topp høydene fra forsøket om uspesifikk binding og er vist som prosenter i tabell 4.15. Hver prøve ble sammenlignet med den prøven i forsøket om uspesifikk binding med samme nummer (tatt ut av samme beholder og analysert samme dag). Det blir tatt høyde for den uspesifikke bindingen av peptidene på kolonnen i utregningene siden topp høydene fra forsøket om uspesifikk binding settes til 100%. Det ble også utført en ensidig t-test (se 4.4.2) for å se om det var en signifikant binding til HSA i tillegg til peptidenes uspesifikke binding på kolonnen. T-verdiene er vist i tabell 4.15 i parentes.

Tabell 4.15: Prosentene viser HSA bindingen av peptidene. T-verdiene for topp høydene i fraksjonene etter opparbeidelse på HiTrap™ kolonnen (N_p) mot topp høydene fra forsøket om uspesifikk binding (N_u) er vist i parentes. De signifikante t-verdiene er uthevet.

nr \ m/z	Peptider fra tryptisk klipp av cytokrom c						MS analyser		Frihetsgrad n=(N _p + N _u)-2	Kritisk verdi (95%)
	339,9	317,85	390,4	302,75	533,9	478,35	N _p	N _u		
1	15,2% (3,50)	37,1% (20,81)	61,5% (21,66)	6,1% (1,39)	44,1% (12,28)	47,0% (13,11)	3	3	4	2,78
2	21,9% (2,76)	43,3% (7,31)	63,2% (19,61)	14,8% (4,16)	56,2% (20,17)	19,1% (-1,05)	3	3	4	2,78
3	28,2% (10,11)	45,8% (19,55)	56,3% (51,35)	16,1% (6,11)	57,9% (19,65)	20,8% (6,58)	3	3	4	2,78
Gj.snitt	21,8 %	42,1 %	60,3 %	12,3 %	52,7 %	16,2 %				

Hver prosentandel (tabell 4.15) representerer nedgangen i konsentrasjon som følge av HSA binding av peptidene fra et tryptisk klipp av cytokrom c. Endringene var i hovedsak signifikante med en gjennomsnittelig nedgang på mellom 12,3 og 60,3%.

Mellom de ulike peptidene var det store forskjeller i den prosentvise nedgangen (12,3-60,3%). Dette kan tyde på ulik affinitet for HSA.

Resultatene i dette forsøket viser at HSA binder peptidene fra et tryptisk klipp av cytokrom c i tillegg til den uspesifikke bindingen som ble vist under 4.7.3.

4.7.5 10% etanol som løsemiddel i mobilfasen på HiTrap™ kolonnen

For peptidene viste 10% etanol eller 10% 1-propanol i 150mM NH₄Ac tilsvarende resultater. Fordi Amersham Biosciences hadde testet kolonnens stabilitet for 20% etanol mens det for 10% 1-propanol ikke var registrert noen stabilitetsdata, ble etanol valgt som løsemiddel i de videre forsøkene for peptidene fra et tryptisk klipp av cytokrom c.

Det ble opparbeidet tre prøver med HSA og peptider på HiTrap™ kolonnen hvor mobilfasen var 10% etanol i 150mM NH₄Ac. Prøvene inneholdt 25µg/ml peptider og 10mg/ml HSA. I alt tre fraksjoner på 27,3ml ble tatt (etter at 1,5ml var pumpet over kolonnen i hvert forsøk). Hver av disse ble analysert tre ganger på LC-MS. Topp høydene ble sammenlignet med de topp høydene som viste HSA bindingen av peptidene (opparbeidet uten 10% etanol i mobilfasen). Prosentene i tabell 4.17 viser denne forskjellen. De negative tallene angir at topp høydene uten 10% etanol i mobilfasen var høyest, mens de positive angir at 10% etanol gav høyest topp høyde.

Tabell 4.17: Prosentene viser forskjellen i topp høyer for forsøkene med (N_E) og uten (N_U) 10% etanol i mobilfasen. Negative tall angir at topp høydene var høyest uten 10% etanol i 150mM NH₄Ac, mens positive tall angir at topp høydene var høyest med 10% etanol i 150mM NH₄Ac. T-verdiene for forskjellen er vist i parentes og de signifikante er uthevet.

nr	m/z	Peptider fra tryptisk klipp av cytokrom c						MS analyser		Frihetsgrad n=(N _E + N _U)-2	Kritisk verdi (95%)
		339,9	317,85	390,4	302,75	533,9	478,35	N _E	N _U		
1		-16,0% (-2,08)	20,2% (8,55)	49,9% (19,21)	-26,3% (-5,63)	23,8% (6,37)	28,4% (6,44)	3	3	4	2,78
2		21,3% (3,51)	42,5% (7,53)	59,8% (33,85)	5,3% (1,58)	55,6% (22,94)	-61,1% (-26,29)	3	3	4	2,78
3		14,5% (3,91)	39,2% (17,94)	46,9% (47,86)	3,3% (0,63)	52,4% (14,76)	-4,1% (-0,87)	3	3	4	2,78
Gj.snitt		6,6%	34,0%	52,5%	-17,7%	43,9%	-12,3%				

Tre av peptidene viste en signifikant økning i topphøyde på mellom 34,0 og 52,5% når 10% etanol tilsettes i mobilfasen (150mM NH₄Ac) som vist i tabell 4.17. Peptidet med m/z 339,9 viser en liten gjennomsnittelig økning i topphøyde på 6,6% (delvis signifikant).

For peptidet med m/z 302,75 og m/z 478,35 var topphøydene (gjennomsnittelig) høyest når mobilfasen var 150mM NH₄Ac alene.

Resultatene i dette kapittelet viser at tilsetning av 10% etanol i mobilfasen (150mM NH₄Ac) kan øke topphøydene av noen peptider med så mye som 29,7 og 48% mens andre ikke blir påvirket i samme grad.

4.7.6 10% 1-Propanol som løsemiddel i mobilfasen på HiTrap™ kolonnen

I forsøkene der peptidhormonene ble brukt som modellsubstanser brøt også 10% 1-propanol i 150mM NH₄Ac bindingene til HSA. Det ble derfor gjort et forsøk med peptider fra et tryptisk klipp av cytokrom c som modellsubstanser med 10% 1-propanol i mobilfasen. Prøvene som ble opparbeidet på HiTrap™ kolonnen inneholdt 25µg/ml peptider sammen med 10mg/ml HSA. Disse ble opparbeidet med og uten 10% 1-propanol i mobilfasen (til sammen to forsøk). Det ble tatt fraksjon på 27,3ml i begge forsøkene etter 1,5ml var pumpet over HiTrap™ kolonnen. Fraksjonene ble analysert tre ganger på LC-MS (på samme dag) og peptidenes topphøyder sammenlignet. Tabell 4.18 viser den prosentvise økningen i topphøyde når 10% 1-propanol ble tilsatt i mobilfasen i forhold til uten (forsøket om HSA binding av peptidene). Det ble også utført en t-test på resultatene. T-verdiene er vist i parentes i tabell 4.18.

Tabell 4.18: Prosentene viser forskjellen i topphøyde for forsøkene med (N_p) og uten (N_U) 10% 1-propanol i mobilfasen. T-verdiene for økningen er angitt i parentes. Alle t-verdiene var signifikante og er derfor uthevet.

Peptider fra tryptisk klipp av cytokrom c						MS analyser		Frihetsgrad $n=(N_p + N_U)-2$	Kritisk verdi (95%)
339,9	317,85	390,4	302,75	533,9	478,35	N_p	N_U		
21,6% (11,07)	22,0% (5,01)	69,1% (13,51)	69,8% (30,40)	78,9% (14,43)	86,6% (14,63)	3	3	4	2,78

Når forsøkene om HSA binding med og uten 10% 1-propanol tilsatt mobilfasen ble sammenlignet var det en signifikant økning i topphøyder for alle seks peptidene. Som vist i tabell 4.17 var oppgangen på mellom 21,6 og 86,6%.

Å bruke 10% 1-propanol i 150mM NH_4Ac ser ut til å øke topphøydene av peptidene (i prosenter) ved opparbeidelsen på HiTrap™ kolonnen enn ved bruk av 10% etanol. Bedringen er dessuten synlig for flere peptider (for etanol var det en signifikant økning på 29,7-48,8% for tre peptider). Siden bare én prøve ble opparbeidet på HiTrap™ kolonnen kan det ikke trekkes konklusjoner om hvorvidt dette stemmer.

For å få bekreftet om konsentrasjonene kan økes mer ved tilsetning av 10% 1-propanol i forhold til 10% etanol, er det nødvendig å utføre flere forsøk. Dette ble ikke gjort i denne oppgaven på grunn av at tiden ikke strakk til.

5 KONKLUSJON

Arbeidet i denne oppgaven viser at det er mulig å fjerne HSA ved opparbeidelse på HiTrap™ kolonnen samtidig med muligheten for å bryte interaksjoner mellom HSA og sterkt bundne peptider ved å tilsette et løsemiddel i mobilfasen.

En metode for opparbeidelse av peptider på HiTrap™ kolonnen med flyktig buffer (150mM NH₄Ac) ble utviklet, slik at bindingen mellom HSA og peptider og bryting av denne kunne studeres. En LC-MS metode for deteksjon av tre peptidhormoner ble utviklet slik at konsentrasjonene i eluatet fra HiTrap™ kolonnen kunne bestemmes. Som modellsubstanser ble vasopressin, bradykinin, melatonin og peptider etter tryptisk klipp av cytokrom c brukt fordi disse bindes til HSA.

Kapasitet av HSA på HiTrap™ kolonnen med 150mM NH₄Ac som mobilfase ble bestemt til 12 mg per kolonne med et gjennombrudd på 5%.

På HiTrap™ kolonnen ble HSA bindingen til vasopressin og melatonin ble brutt både når 10% etanol eller når 10% 1-propanol var tilsatt mobilfasen (150mM NH₄Ac). I forhold til standardprøver var det ingen signifikant endring i konsentrasjon for disse to peptidhormonene. Albuminbindingen av bradykinin og var det derimot ikke mulig å bryte.

Peptider etter et tryptisk klipp av cytokrom c (seks stykker ble identifisert etter LC-MS analyse) ble opparbeidet på HiTrap™ kolonnen med 10% etanol i mobilfasen (150mM NH₄Ac). Det ble registrert en signifikant økning i tre av seks peptiders konsentrasjon (mellom 29,6 og 48,8 %) i forhold til når 150mM NH₄Ac ble brukt alene som mobilfase. Et enkeltforsøk med 10% 1-propanol i mobilfasen gav en indikasjon på en enda større konsentrasjonsøkning (21,6-86,6%) for alle de seks peptidene.

Framtidig arbeid

I denne oppgaven har det blitt utført innledende forsøk mot det å kunne opparbeide humane serumprøver ved hjelp av HiTrap™ kolonnen. Mye arbeid gjenstår før metoden blir optimal, men resultatene danner et godt grunnlag for videre utvikling av metoden for å fjerne HSA med nedsatt tap av peptider.

Effekten av 10% 1-propanol i 150mM NH₄Ac bør undersøkes nærmere og dersom dette gir bedre resultater (enn 10% etanol), må kolonnens toleranse for dette løsemiddelet testes grundig. Peptidene blir fortynnet veldig mye, hele 27,3 ganger gjennom opparbeidelsen. Det bør derfor utarbeides en metode for påfølgende oppkonsentrering. Det bør også kontrolleres hvilke andre proteiner som bindes på HiTrap kolonnen da kolonnematerialet ikke selektivt binder bare HSA. Dessuten vil det bli nødvendig å validere og standardisere metoden etter ICH sine retningslinjer før det kan trekkes konklusjoner om metodens egnethet.

6 REFERANSELISTE

AmershamBiosciences (12.06.2005). "Instructions- HiTrap Blue HP, 1ml and 5ml", [http://www5.amershambiosciences.com/applic/upp00738.nsf/vLookupDoc/148896405-B345/\\$file/71700300AL.pdf](http://www5.amershambiosciences.com/applic/upp00738.nsf/vLookupDoc/148896405-B345/$file/71700300AL.pdf), Wikstroms, Sweden.

AmershamBiosciences (13.06.2005). "HiTrap Blue HP 1ml and 5 ml" [http://www5.amershambiosciences.com/applic/upp00738.nsf/vLookupDoc/148896405-B345/\\$file/71700300AL.pdf](http://www5.amershambiosciences.com/applic/upp00738.nsf/vLookupDoc/148896405-B345/$file/71700300AL.pdf), Wikstroms, Sweden.

AmershamBiosciences (28.04.2005). "HITRAP BLUE HP 5x1ML, Article No: 17041201 Application area" (E-mail fra Askerud,C ved GE Healthcare).

Barnidge, D. R., M. K. Goodmanson, et al. (2004). "Absolute Quantification of the Model Biomarker Prostata-Spesific Antigen in Serum by LC-MS/MS Using Protein Cleavage and Isotope Dilution Mass Spectrometry." Journal of Proteome Research(3): 644-652.

Bastian, p. J., G. S. Palapattu, et al. (2005). "Preoperative Serum DNA *GSTP1* CpG Island Hypermethylation and Risk of Early Prostate-Specific Antigen Recurrence Following Radical Prostatectomy." Clinical Cancer Research **11**: 4037-4043.

Bjorhall, K., T. Miliotis, et al. (2005). "Comparison of different depletion strategies for improved resolution in proteomic analysis of human serum samples." Proteomics **5**: 307-317.

Echan, L. A., H.-Y. Tang, et al. (2005). "Depletion of multiple high abundance proteins improves protein profiling capacities of human serum and plasma." Proteomics **5**: 3292-3302.

Fahrner, R. L. and G. S. Blank (1999). "Real-time monitoring of recombinant antibody breakthrough during protein A affinity chromatography." Biotechnol. Appl Biochem(29): 109-112.

Gaskell, S. J. (1997). "SPECIAL FEATURE: TUTORIAL Electrospray: Principles and Practice." Journal of Mass Spectrometry **32**: 677-688.

Greibrokk, T., E. Lundanes, et al. (1998). "Kromatografi", Universitetsforlaget AS.

Hardman, J. G. and L. E. Limbird (2001). "Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics". USA, McGraw-Hill.

Hollung, K. (19.08.2005). "Det 17. landsmøtet i kjemi, K6: Proteomikk: Identifikasjon av proteiner ved to-dimensjonal elektroforese og massespektrometri"
<http://www.kjemi.uio.no/nks/abstracts.html>, Universitetet i Oslo.

Kuhn, E., J. Wu, et al. (2004). "Quantification of C-reactive protein in the serum of patients with rheumatoid arthritis using multiple reaction monitoring mass spectrometry and c^{13} -labeled peptide standards." Proteomics(4): 1175-1186.

Langmyhr, F. J. (1987). "Elementære statistiske metoder for kjemisk analyse". Oslo, Universitetsforlaget AS.

Liebler, D. C. (2002). "Introduction to Proteomics: Tools for the New Biology", Humana Press, Inc.

Liu, H., C. Sabus, et al. (2002). ""Use of linear gradient flow program for liquid chromatography-mass spectrometry protein-binding studies"." Journal of Chromatography A(955): 237-243.

Nelson, D. L. and M. M. Cox (2000). "Lehninger Principles of Biochemistry", Worth Publishers.

Peters, T. J. (1996). "All about Albumin- Biochemistry, Genetics, and Medical Applications", Academic Press inc.

Petrovic, S. (23.09.2005). "Chapter 11 & 20 - Mass Spectrometry"
<http://www.sou.edu/chem/ch425/MassSpec-Chapter20/sld023.htm>.

Reubsaet, L. (2003). "Use of LC-MS in Bio-analysis of Pharmaceuticals and Macromolecules". Oslo, Unipub AS.

Tissue, B. M. (23.09.2005). "Quadrupole Mass Spectrometry"
<http://www.chem.vt.edu/chem-ed/ms/quadrupo.html>.

UniversityOfCalifornia (13.06.2005). "MS-Digest in ProteinProspector 4.0.5"
<http://prospector.ucsf.edu/ucsfbin4.0/msdigest.cgi>.

Vander, A., J. Sherman, et al. (2001). "Human Physiology- The Mechanisms of Body Functions", McGraw-Hill.

Venes, D. and C. L. Thomas (2001). "Taber's cyclopedic medical dictionary", Davis Company.

Winther, B. (2005). "30min.grad 0-60% spes.low SC.qlm" (protokoll).